

UNTERSUCHUNGEN ZUM PURIN-TRANSPORT
BEI SACCHAROMYCES

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
vorgelegt dem Fachbereich Biologie der
Freien Universität Berlin

von
Margrit Winter
aus Reitendorf

1972

UNTERSUCHUNGEN ZUM PURIN-TRANSPORT
BEI SACCHAROMYCES

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der
Doktorwürde

vorgelegt dem Fachbereich Biologie der
Freien Universität Berlin

von
Margrit Winter
aus Reitendorf



Tag der mündlichen Prüfung: 2.5.1972

1. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. K. Graczyński

INHALTSVERZEICHNIS

	<u>Seite</u>
1. <u>Einführung</u>	1
1. 1 Grundzüge des Purin-Stoffwechsels bei den Hefen <i>Saccharomyces</i> und <i>Schizosaccharomyces</i>	1
1. 2 Einige Grundlagen über den Transport organi- scher Moleküle durch biologische Membranen	4
1. 2. 1 Die erleichterte Diffusion	4
1. 2. 2 Der aktive Transport	5
1. 2. 3 Transport-Modelle	6
2. <u>Material und Methoden</u>	10
3. <u>Experimentelle Charakterisierung des Purin- Transportsystems von <i>Saccharomyces</i></u>	14
3. 1 Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der Wachstumskurve	14
3. 2 Aufnahmegeschwindigkeit der stationären Zellen in Abhängigkeit von der Präinkubation in Glu- cose	15
3. 3 Temperaturabhängigkeit der Aufnahmegeschwin- digkeit	17
3. 4 Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit als Funk- tion der externen Substrat-Konzentration	18
3. 5 Untersuchungen zur Inhibition des Purin-Trans- ports	21
3. 5. 1 Wechselseitige Hemmung der natürlichen Purin- basen untereinander	21
3. 5. 2 Hemmung durch Basenanaloga	24
3. 5. 3 Hemmung durch "prefilling"	25
3. 5. 4 Hemmung durch Energiegifte	27
3. 6 Versuche zur intrazellulären Akkumulation von Purinbasen	28
3. 7 Untersuchungen zur Energieabhängigkeit des Purin-Transports	32

	<u>Seite</u>
3.8 Untersuchungen zum Efflux aufgenommener Purinbasen	37
4. <u>Entwicklung und Diskussion eines Purin-Trans-</u> <u>portmodells</u>	40
5. <u>Zusammenfassung</u>	49
<u>Literaturverzeichnis</u>	51

1. EINFÜHRUNG

1.1 Grundzüge des Purin-Stoffwechsels bei den Hefen *Saccharomyces* und *Schizosaccharomyces*

Die Purinderivate Adenin, Guanin und als "seltene" Base auch Hypoxanthin sind Bausteine von Nukleinsäuren und Coenzymen und damit essentiell für die Vermehrung der Organismen und die Aufrechterhaltung ihrer Lebensfunktionen.

Der Purinkörper kann nach einem - allen bisher untersuchten Organismen im Prinzip gemeinsamen - Reaktionsschema in 10 enzymkatalysierten Schritten aus Asparaginsäure, Glycin, Glutamin, "aktivierter" Ameisensäure und Kohlendioxid mit Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) als "Kristallisationskeim" unter Verbrauch von 6 ATP-Einheiten neu gebildet werden. Das als Produkt dieser de novo Synthese entstehende Inosin-5'-monophosphat (IMP) kann in jeweils zwei Schritten zu Adenosin-5'-monophosphat (AMP) oder Guanosin-5'-monophosphat (GMP) aminiert werden (s. Abb. 1), welche wiederum Ausgangssubstanzen für die Synthese von Nukleinsäuren und zahlreichen Coenzymen sind. Bei Hefen wird die de novo Synthese durch Endprodukthemmung ihres ersten Enzyms, der PRPP-amidotransferase, im wesentlichen über den Nucleosid-5'-monophosphat-pool reguliert (BURNS 1964, NAGY 1970, SATYANARAYANA und KAPLAN 1971). Die Konversion des IMP zu AMP bzw. GMP wird durch Retroinhibition der jeweils ersten Enzyme (Adenylosuccinat synthetase, IMP dehydrogenase) kontrolliert (DJEMBO-TATY et al. 1972, POURQUIÉ 1969). Die Synthese der IMP dehydrogenase ist zusätzlich reprimierbar (REICHERT und WINTER 1972). Freie Basen treten während der de novo Synthese nicht auf. Sie können jedoch - entweder als Degradationsprodukte des Nukleinsäureturnovers oder aus dem umgebenden Medium aufgenommen, - in jeweils einem Reaktionsschritt unter Verbrauch eines PRPP-Moleküls in die entsprechenden Nucleosid-5'-monophosphate umgesetzt werden (sal-

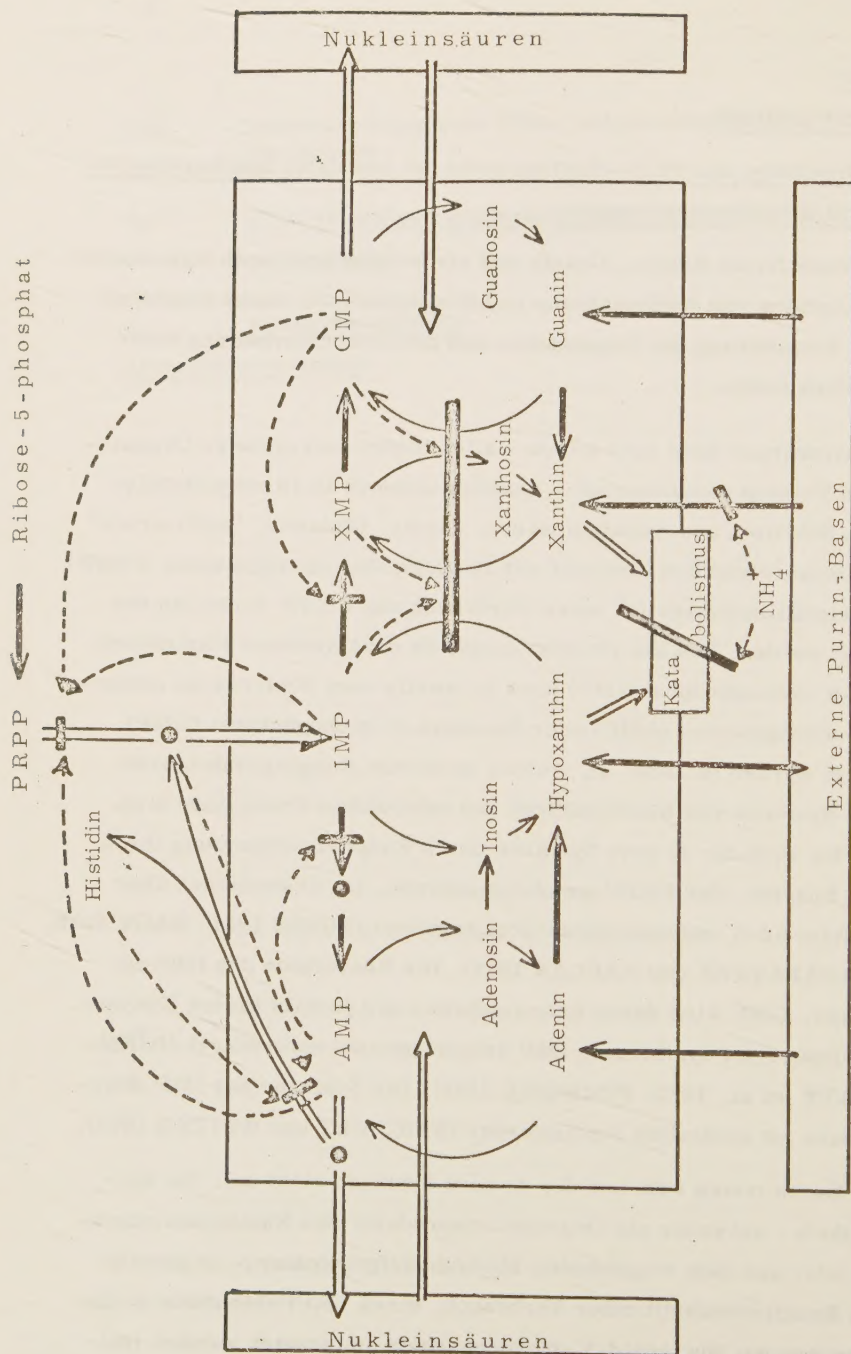


Abb. 1. Schematische Darstellung der Purin-Interconversion und ihre Beziehung zu Purin-liefernden und verbrauchenden Prozessen (nach REICHERT et al. 1972).

→ einzelner Reaktionsschritt; ⇌ mehrere Reaktionsschritte; ● Zwischenprodukt; ↗ regulierte Reaktionen; --- → Rückkopplungsbeziehungen (feedback-Hemmung; Repression).

vage pathway). Hierfür stehen zwei Enzyme zur Verfügung, die AMP-pyrophosphorylase für Adenin und die IMP-pyrophosphorylase für Hypoxanthin, Xanthin und Guanin. Zumindest die IMP-pyrophosphorylase wird durch einen Überschuß an IMP, GMP oder Xanthosin-5'-monophosphat (XMP) gehemmt (deGROOT 1969). Die Nucleosid-5'-monophosphate wiederum können durch weitere Enzymsysteme zu den entsprechenden Nucleosiden und Basen degradiert werden. Ferner ist eine Desaminierung des Adenins zu Hypoxanthin (mit Hilfe der Adenosin-desaminase) und des Guanins zu Xanthin (mit Hilfe der Guanase) möglich. Einen Überblick über die einzelnen Interconversions-Möglichkeiten bei *Schizosaccharomyces pombe* geben die Arbeiten von POURQUIÉ und HESLOT (1971) und POURQUIÉ (1972).

Vom energetischen Standpunkt aus betrachtet erscheint die Ausnutzung eines externen Basenangebots weitaus ökonomischer für die Zelle als die de novo Synthese, da für den salvage pathway außer PRPP offenbar keine zusätzliche Energie benötigt wird. Die Zellen sollten daher wirksame Transportsysteme für Purine entwickelt haben. Im Gegensatz zum allgemeinen Purinstoffwechsel liegen jedoch zu diesem Problem nur wenige, dazu noch recht widersprüchliche Untersuchungen vor (HARRIS und THOMPSON 1962, ROUSH und SHIEH 1962, CUMMINS und MITCHISON 1967, POURQUIÉ 1970, BERLIN und STADTMAN 1966).

Die Interpretation der von den einzelnen Autoren an verschiedenen Hefen gewonnenen Versuchsergebnisse reicht von einfacher Diffusion bis zum aktiven Transport. Es scheint daher nützlich zu sein, an einem ausgewählten Beispiel, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, den Transportprozeß für einige biologisch relevante Purinderivate genauer zu analysieren.

Bevor auf methodische Einzelheiten, Versuchsansätze und -ergebnisse eingegangen wird, sollen die wesentlichen Prinzipien und Mechanismen, wie sie in den letzten Jahren für den Stofftransport durch Membranen verschiedenster Herkunft (im wesentlichen Bakterien, Mitochondrien,

Erythrozyten) entwickelt wurden, kurz rekapituliert werden.

1.2 Einige Grundlagen über den Transport organischer Moleküle durch biologische Membranen

Alle Lebensvorgänge laufen grundsätzlich in Kompartimenten ab, die sich in ihrer Zusammensetzung wesentlich von ihrer Umgebung unterscheiden können. Als Diffusionsbarrieren zwischen äußerem und innerem Milieu fungieren Lipid-Doppelschichten mit ein- und aufgelagerten Proteinen (Membranen).

An künstlichen Lipidfilmen konnte gezeigt werden, daß die meist lipophoben Nährstoffe nur sehr langsam durch sie hindurchdiffundieren können; für Ionen sind sie praktisch impermeabel.

Um dennoch einen Austausch bestimmter Stoffe zu gewährleisten, haben die Zellen selektive Transportmechanismen entwickelt, die für gleiche Moleküle bei den einzelnen Organismen recht unterschiedlich wirken können.

Es lassen sich zwei Grundmechanismen unterscheiden:

1. Erleichterte Diffusion oder katalysierte Permeation
2. Aktiver Transport.

1.2.1 Die erleichterte Diffusion

Wie bei der reinen Permeation ist hier im einfachsten Falle ein Gradient zwischen der Innen- und Außenkonzentration eines Metaboliten die treibende Kraft für seinen Transport. Der Transportvorgang ist im Prinzip abgeschlossen, wenn ein Konzentrationsausgleich der freien, nicht an irgendwelche Strukturen gebundenen Moleküle erreicht ist.

Gegenüber der reinen Permeation ist jedoch die Transportgeschwindigkeit durch Benutzung eines "Carriers" als Vehikel stark erhöht. Die begrenzte Anzahl der Carrier-Moleküle in einer Membran führt dazu, daß die Transportrate mit steigender Substratkonzentration einen Sätti-

gunzwert erreicht. Damit entspricht die erleichterte Diffusion einer enzymkatalysierten Reaktion, auf die sich formal die Michaelis-Menten-Kinetik anwenden läßt.

1.2.2 Der aktive Transport

Durch aktiven Transport sind Zellen befähigt, Stoffe auch gegen einen Konzentrationsgradienten aufzunehmen. Da Konzentrierung eines Stoffes Entropieabnahme bedeutet, muß hierfür Energie aufgewendet werden. Ein aktives Transportsystem muß daher in der Lage sein, Energie in Form energiereicher Moleküle des Zellmetabolismus nutzbar zu machen.

Bei den üblichen tracerkinetischen Untersuchungen am lebenden Objekt kann leicht der Eindruck aktiven Transports entstehen, wenn das Substrat unmittelbar nach der Aufnahme metabolisiert oder an Zellkomponenten gebunden wird.

SITTE hat daher 1969 die Überprüfung folgender Kriterien vorgeschlagen, ehe von aktivem Transport gesprochen wird.

Für den klaren Nachweis aktiver Aufnahme eines Substrates in eine Zelle (oder Zellkomponente) muß sichergestellt sein, daß

1. das Substrat in seiner ursprünglichen Form und ungebunden in der Zelle vorliegt,
2. zwischen dem Verbrauch energiereicher Moleküle und transportierter Substanzmengen eine stöchiometrische Beziehung besteht,
3. die Energie tatsächlich für den Transport des betrachteten Stoffes verwendet wurde.

Im übrigen sollten die Merkmale der erleichterten Diffusion zutreffen (Analogie zu einer enzymkatalysierten Reaktion). Zwei Beispiele sollen zeigen, daß es bei der Analyse eines Transportsystems nicht ausreicht nur einen der drei Punkte zu verifizieren, will man sich der strengen Definition von SITTE anschließen.

1. Austausch-Diffusion (Counterflow)

Werden Zellen, die für zwei Substrate S_1 und S_2 einen gemeinsamen m

bilen Carrier haben, mit beiden Substraten beladen und anschließend in ein Medium übertragen, das bezüglich S_1 isotonisch ist, jedoch kein S_2 enthält, wird Efflux von S_2 stattfinden und im Austausch S_1 gegen einen steigenden Konzentrationsgradienten einfließen (1957 für strukturanaloge Zucker durch ROSENBERG und WILBRANDT nachgewiesen).

Es wird auf diese Weise Akkumulation eines Substrates ohne Kopplung an eine metabolische Energiequelle erreicht.

2. Co-Transport

Nach einem von CRANE 1965 vorgeschlagenen Modell gelangen im Dünndarmsystem Na^+ -Ionen und Aminosäuren über einen gemeinsamen Carrier in die Zelle. Da jedoch Na^+ wieder aktiv aus der Zelle gepumpt wird, fließen Na^+ -Ionen auf Grund des entstehenden Gefälles permanent in die Zelle nach. Der Carrier muß aber, um funktionsfähig zu sein, beide Substrate gleichzeitig binden. So bewirkt der Na^+ -Einstrom auch einen weiteren Influx der Aminosäure, was zu einer erheblichen Akkumulation des Metaboliten führen kann. Energie wird jedoch nur für den Na^+ -Transport aus der Zelle aufgewendet. Zumindest Kriterium 3 trifft hier für den Transport der Aminosäure nicht zu.

1.2.3 Transport-Modelle

PARDEE hat 1968 als Diskussionsgrundlage den Carrier-vermittelten Transport in 4 Teilschritte zerlegt (s. Abb. 2).

1. Recognition: Bindung des Substrates an das Transportsystem.
2. Translocation: Transport des gebundenen Substrats von der Außen- an die Innenseite der Membran.
3. Release: Freisetzung des gebundenen Substrats in das Innere der Zelle.
4. Recovery: Wiederherstellung der Ausgangssituation.

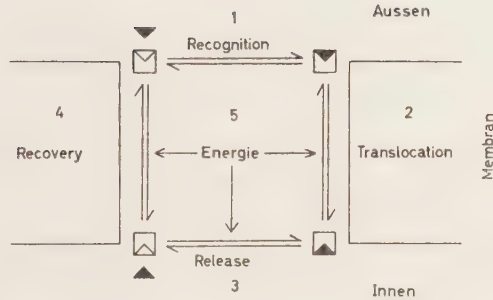


Abb. 2 Transportgrundmodell nach PARDEE (1968).
(Näheres siehe Text)

Beim aktiven Transport soll einer der Schritte 2 - 4 mit einer metabolischen Energiequelle gekoppelt sein.

Dieses mehr allgemeine Transportsystem ist als Ausgangsbasis für Transportuntersuchungen geeignet.

Ergänzend seien einige detaillierte Vorstellungen über den Transportmechanismus, die Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen sind, vorgestellt.

Im einfachsten Fall wird der Carrier als eine mobile niedermolekulare Membrankomponente angenommen, die innerhalb der Lipidphase oszillieren oder Rotationsbewegungen ausführen kann. Da Stereospezifität und genetische Induzierbarkeit bestimmter Transportsysteme am ehesten durch die Proteinnatur beteiligter Komponenten erklärt werden kann, führten COHEN und MONOD 1957 das Konzept der Permease ein, eines hypothetischen Enzyms, das den Transport katalysiert. KEPES 1960 und KEPES und COHEN 1962 präzisierten aus bis dahin bekannten Versuchsergebnissen - hauptsächlich über den Zuckertransport in *E. coli* - diese Vorstellung (Abb. 3):

TRÄGERMODELL

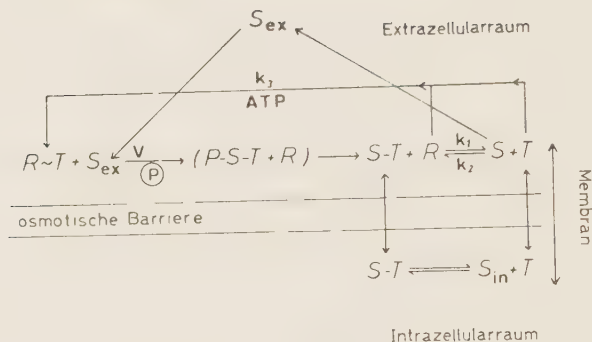


Abb. 3 Permease-Träger-Modell nach KEPES (1960)

Eine fest in der Membran lokalisierte Permease P koppelt das externe Substrat S_{ex} an einen weniger spezifischen Carrier (Träger T). Der Carrier-Substrat-Komplex durchdringt die Lipidschicht und dissoziiert an der Membranninnenseite.

Dieses Modell wird stark durch Versuchsergebnisse von EGAN und MORSE (1965) unterstützt. Sie konnten zeigen, daß durch eine Mutation die Aufnahmefähigkeit der Bakterienzelle für mindestens 9 Zucker verloren geht. Da jeder der Zucker eine spezifische Permease besitzt, sollte die Mutation den weniger spezifischen, gemeinsamen Carrier betreffen.

Entgegen diesem Modell, bei dem nur der Recognition-Schritt permease katalysiert ist, wird die Ansicht vertreten, daß die Permease selbst auch die Translokation und nachfolgende Schritte durchführt (vgl. z. B. WINKLER und WILSON 1967). Die bisher isolierten Transportproteine

(Bindungsproteine) sind groß genug, um die Membran zu überbrücken. Das relativ fest fixierte Protein könnte durch konformationelle Veränderung eine Passage in der Membran öffnen oder das aktive Zentrum von einer Seite zur anderen bewegen.

Versuche mit einem von PARDEE et al. (1966, 1967) isolierten Sulfatbindungsprotein aus *Salmonella typhimurium* lassen jedoch auf einen komplizierteren Mechanismus schließen, da das Protein weder in Lipiden löslich ist, noch Konformationsänderungen durch Bindung von Sulfat eingeht. Da das Sulfat-Transportsystem außerdem von insgesamt drei Cistronen codiert wird, ist das Zusammenwirken mehrerer Proteine wahrscheinlicher.

Als das heute auf molekularem Niveau bestuntersuchte Transportsystem für Nichtelektrolyten kann das Phosphoenolpyruvat-transferase-System in Bakterien gelten (siehe z. B. der Übersichtsartikel von KABACK 1970).

In diesem membrangebundenen System (s. Abb. 4) katalysieren drei

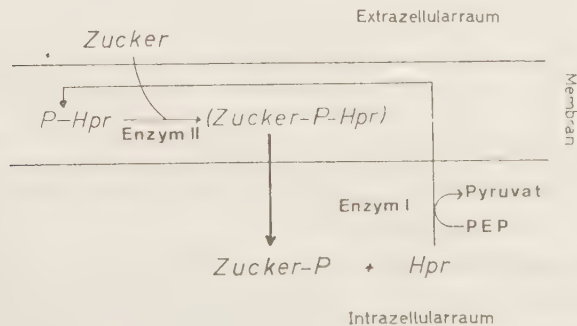


Abb. 4 PEP-Phosphotransferase-System nach SIMONI et al. (1967).
(Näheres siehe Text)

Proteine sowohl Transport als auch Phosphorylierung von Zuckern.

Ein hitzestabiles, niedermolekulares Protein Hpr wird durch Enzym I unter Hydrolysierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) phosphoryliert und dient nun als Energiedonor für die von Enzym II katalysierte Reaktion, die zugleich die Translocation des Zuckers bewirkt. Die Zucker werden phosphoryliert in die Zelle abgegeben. Da sie nicht durch die Membran zurückdiffundieren können, wird Akkumulation erreicht.

Nach der strengen Definition von SITTE darf auch bei diesem System nicht von aktivem Transport gesprochen werden, da Kriterium I nicht zutrifft. Die Nützlichkeit dieser sehr strengen Auslegung müßte daher insbesondere im Hinblick auf den Transport von Nichtelektrolyten überprüft werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Materialien

8-¹⁴C-markierte Basen Adenin (28,9 mCi/mMol), Guanin (7,3 mCi/mMol) und Hypoxanthin (2,07 mCi/mMol) wurden von NEN Chemicals, Dreieichenhain, geliefert, Glasfaserfilter und Membranfilter von Sartorius Göttingen, Enzyme für die Pool-Tests sind bei Boehringer/Mannheim erhältlich und Yeast Nitrogen-Base bei Difco/Detroit.

Organismus und Kulturbedingungen

Der verwendete tetraploide Saccharomyces-Stamm 2200 wurde früher beschrieben (REICHERT 1969).

Aufzucht erfolgte bei 30°C unter Belüftung und Schütteln in einem synthetischen Medium (2 % Glucose, 1 % Yeast-Nitrogenbase, 0.5 % Pepton), das keine Nukleinsäurebasen enthält. Das Wachstum der Zellpopulation wurde durch Messung der Zelldichte im Lange-Kolorimeter oder durch mikroskopische Auszählung verfolgt.

Messung der Aufnahme

Wenn nicht anders vermerkt, wurden für die Aufnahmemessungen Zellen aus einer 24 Stunden alten Kultur 3 mal mit 0.05 M Natrium-Citrat-Puffer (Puffer), pH 5, gewaschen und in dem gleichen Puffer, 2 % Glucose enthaltend, (Glucose-Puffer) mit einem Titer von ca. 2×10^8 Zellen/ml bei 25°C unter starkem Rühren 2 Stunden präinkubiert.

Nach der Präinkubation wurde der Zelltiter auf 4×10^7 Zellen/ml mit frischem Glucose-Puffer verdünnt und im Verhältnis 1:1 mit der in Glucose-Puffer gelösten 8-¹⁴C-Purinbase (spezifische Radioaktivität wie oben angegeben) vermischt. In bestimmten Zeitintervallen wurden 0.5 ml dieser Mischung auf Glasfaserfilter abfiltriert, mit destilliertem Wasser gut gewaschen, getrocknet und die inkorporierte Radioaktivität in einem Omnifluor-Toluol-Gemisch (4 g/Liter) mit Hilfe eines Flüssigkeitsszintillationszählers (Beckman, Zählausbeute ca. 80 %) gemessen. Die Temperatur während der Aufnahme betrug 25°C.

Pool Extraktion

Zur Bestimmung der intrazellulären pool-Konzentrationen wurden 1×10^9 Zellen auf Membranfilter (25 mm, 1.2μ) gesammelt, in ein 100 ml Erlenmeyerkölbchen übertragen, mit 0.2 ml Äthanol benetzt und mit 2 ml 1 N Essigsäure vom Filter gewaschen, eingefroren und bis zur Trockenheit lyophilisiert.

Mehrmaliges Auftauen, Schütteln und Wiedereinfrieren der Suspension (wie von NAZER et al. 1968 empfohlen) führte nicht zur Erhöhung der Ausbeute.

Das Lyophilisat wurde in 3 ml des für den jeweiligen Test verwandten Puffers suspendiert, stark geschüttelt und 20 Minuten bei 15 000 Upm abzentrifugiert. Der Überstand (Zellextrakt) wurde zur Poolbestimmung benutzt.

Basen-Bestimmung mit der Ionenaustauschersäule

Hierfür wurde das Lyophilisat in 0.5 ml 0.15 M Natrium-Acetatpuffer, pH 7.0, aufgenommen und vor der Zentrifugation sorgfältig mit KOH neu-

tralisiert.

Proben von 50-100 μ l wurden auf eine mit dem Natrium-Acetat-Puffer äquilibrierte Beckman M-71-Säule (0,6 x 29 cm, mit Heizmantel) gegeben und bei 40°C und einer Durchlaufgeschwindigkeit von 0,5 ml/min mit dem gleichen Puffer eluiert.

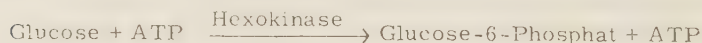
Die Transmission des Eluats wurde in einer Durchflußküvette bei 260 nm gemessen und von einem automatischen Schreiber registriert. Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Zugabe inaktiver Basen zum Zell-extrakt.

Enzymatische Pool-Bestimmungen

Die folgenden enzymatischen Bestimmungsmethoden wurden nach H. U. BERGMEYER (1970) den Konzentrationsverhältnissen im Zellextrakt angepaßt. Bis zu 200 μ l des Extrakts wurden mit 1000 μ l der unten angeführten "Pool-Mischungen" in einer 1 ml Quarzküvette vermischt und die Extinktionsänderung nach Enzymzugabe bei der angegebenen Wellenlänge automatisch aufgezeichnet.

ATP- und Glucose-6-Phosphat-Bestimmung

Folgende enzymatischen Reaktionen liegen dem Test zugrunde:



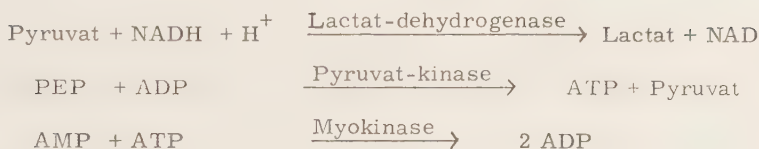
Pool-Mischung: 10 mg NADP-Na₂ und 600 mg Glucose in 15 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, 7 mM MgCl₂ enthaltend.

Dem Reaktionsansatz wurden nacheinander 1 μ l G-6-P-dehydrogenase (1 mg/ml) und 5 μ l Hexokinase (10 mg/ml) hinzugegeben.

Aus der schrittweisen Extinktionszunahme bei 340 nm wurde unter Berücksichtigung der Eigenabsorption des Enzyms und der Verdünnung die G-6-P- und ATP-Konzentration im Zellextrakt berechnet. (Molarer Extinktionskoeffizient: $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$).

Phosphoenolpyruvat-Bestimmung

Die Bestimmung erfolgte nach folgendem Prinzip:

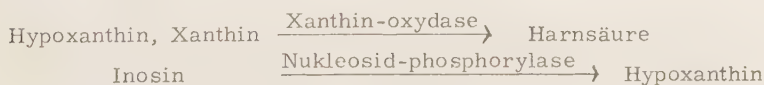


Pool-Mischung: 3 mg NADH, 6 mg ATP-Na₂ x 3 H₂O, 20 mg AMP-Na₂ x 6 H₂O, 100 mg MgCl₂ x 7 H₂O, 50 mg KCl, 50 µl Myokinase (2 mg/ml), in 15 ml Tris-HCl-Puffer, pH 7.5, 7 mM MgCl₂ enthaltend.

Nacheinander wurden 5 µl Lactat-dehydrogenase (5 mg/ml), und 5 µl Pyruvat-kinase (10 mg/ml) zum Reaktionsansatz gegeben und die Extinktion bei 340 nm aufgezeichnet. Aus der Extinktionsabnahme nach Zugabe von Pyruvat-kinase wurde die PEP-Konzentration mit einem Extinktionskoeffizienten von $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ berechnet.

Hypoxanthin- und Inosin-Bestimmung

Dieser Bestimmung liegen die folgenden Reaktionen zugrunde:



Zur Hypoxanthin-Bestimmung wurde dem 1:1 mit 0.1 M Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.4, verdünnten Zellextrakt 5 µl Xanthin-Oxydase (10 mg/ml) hinzugefügt und die Harnsäure-Bildung durch Extinktionsmessung bei 300 nm ($\epsilon_{300} = 9,8 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$) bestimmt.

In einer Reihe von Testmessungen wurde durch eine Zweitmessung bei 280 nm sichergestellt, daß der Xanthinanteil im Extrakt vernachlässigbar klein ist. Bei dieser Wellenlänge haben Xanthin und Harnsäure im Gegensatz zu Hypoxanthin die gleiche molare Extinktion.

Zugabe von 5 µl Nukleosid-Phosphorylase (1 mg/ml) führte zu erneuter Harnsäurebildung, die nur auf den Abbau von Inosin zu Hypoxanthin zurückzuführen ist, da das Enzym nicht signifikant mit Xanthosin und Aden

sin reagiert.

Guanin-Bestimmung

Analog zur Hypoxanthin-Inosin-Bestimmung wurde dem 1:1 mit 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7.4, verdünnten Zellextrakt nacheinander 5 μ l Xanthin-Oxydase und 5 μ l Guanase (10 mg/ml) hinzugefügt.

Aus der Extinktionsänderung nach Guanasezugabe wurde die vorhandene Guanin-Konzentration mit einem Extinktionskoeffizienten von $9 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ berechnet.

Im Guanasepräparat enthaltene Nukleosid-phosphorylase führte zu einer Kriechreaktion, die durch Extrapolation korrigiert wurde.

3. EXPERIMENTELLE CHARAKTERISIERUNG DES PURIN-TRANSPORT SYSTEMS VON SACCHAROMYCES

3.1 Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der Wachstumskurve

Werden Hefezellen in eine frische Nährlösung inkubiert und bei physiologischen Temperaturen bebrütet, so zeigt die Zunahme der Zellzahl einen für alle Mikroorganismen charakteristischen Verlauf. Nach einer anfänglichen Verzögerungsphase (lag-Phase) steigt der Zelltitel exponentiell an, bis irgendein Nährstoff des Mediums erschöpft ist (log-Phase). Von da an hält sich die Zellzahl für längere Zeit auf einem konstanten Niveau (stat. -Phase). Aus zahlreichen physiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß in den einzelnen Wachstumsphasen unterschiedliche Enzyme besonders aktiv, andere wiederum praktisch inaktiv oder gar nicht vorhanden sind. Verfolgt man nun die Aufnahmegeschwindigkeit einer Purinbase (z. B. Guanin, s. Abb. 5) in Abhängigkeit des Wachstums der Population in einem Standardmedium (GYNP), so stellt man eine Zunahme der Aufnahmerate bis zum Erreichen eines Maximalwertes in der ersten Hälfte der log-Phase fest. In der zweiten Hälfte der exponentiellen Phase sinkt die Aufnahmegeschwindigkeit wieder ab und erreicht ein gleichblei-

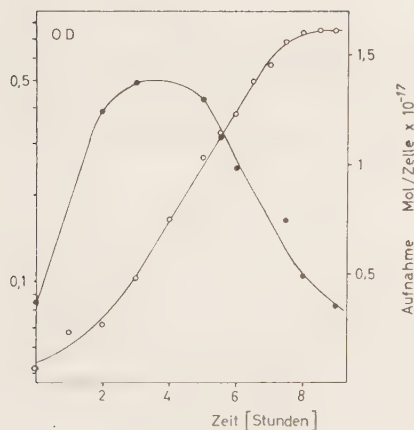


Abb. 5 Aufnahmerate in Abhängigkeit von der Wachstumsphase

(Die Zunahme des Zelltiters wurde durch Messung der optischen Dichte (o) verfolgt. In Intervallen wurden Proben entnommen, in Puffer auf 1×10^8 Zellen/ml eingestellt und die Aufnahme von Guanin (●) über 2 min gemessen.

bendes Niveau von etwa 1/10 des Maximalwertes in der stat-Phase. Ein gleichartiger Aufnahmeaktivitäts-Verlauf wird auch mit Hypoxanthin oder Adenin als Purinquelle erzielt. Er läßt sich durch erhöhte Nukleinsäure-Synthese, Speicher-pool-Bildung aufgrund eines hohen Energieangebotes oder beides zum Beginn des exponentiellen Wachstums erklären.

3.2 Aufnahmegeschwindigkeit bei stationären Zellen in Abhängigkeit von der Präinkubation in Glucose

Sollte das erhöhte Energieangebot der entscheidende Faktor für die Erhöhung der Aufnahmegeschwindigkeit zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase sein, so sollten auch stationäre Zellen nach Präinkuba-

tion in einer Glucoselösung bei Abwesenheit einer weiteren Stickstoffquelle maximale Purin-Aufnahme zeigen. Das ist in der Tat der Fall. Wie aus Abb. 6 hervorgeht, nimmt nach 15 Minuten Präinkubation in

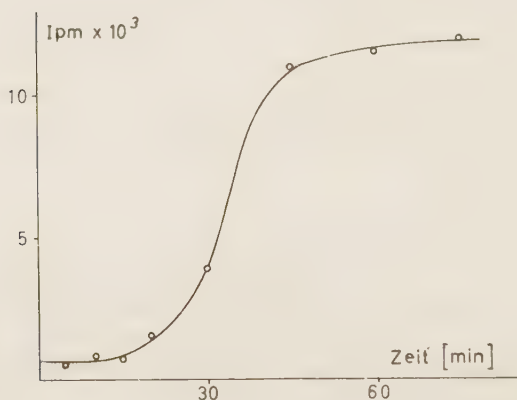


Abb. 6 Anfangsgeschwindigkeit der Adenin-Aufnahme in Abhängigkeit von der Präinkubation in Glucose-Puffer.

(Aufnahmemessung mit $4 \mu\text{M}$ $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin, Inkubationszeit 1 Minute).

Glucose-Puffer die Aufnahmerate stark zu. Nach etwa 60 Minuten (in manchen Versuchen erst nach 2 Stunden) ist ein Sättigungswert erreicht, der der maximalen Aufnahmegeschwindigkeit während des exponentiellen Wachstums entspricht. Für die nun folgenden Versuche zur Charakterisierung des Purin-Transportsystems wurden in Glucoselösung präinkubierte stationäre Zellen verwandt, da sie sich in einem definierten physiologischen Zustand befinden als Zellen aus der log-Phase.

3.3 Temperaturabhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit

Hefezellen erreichen - abgesehen von einigen Mutanten - eine optimale Wachstumsgeschwindigkeit bei Temperaturen um 35°C (s. z. B. REICHERT 1969). In diesen Bereich fällt das Aktivitätsoptimum zahlreicher Enzyme. Wie aus Abb. 7 hervorgeht, nimmt auch die initiale Aufnahmegeschwindigkeit

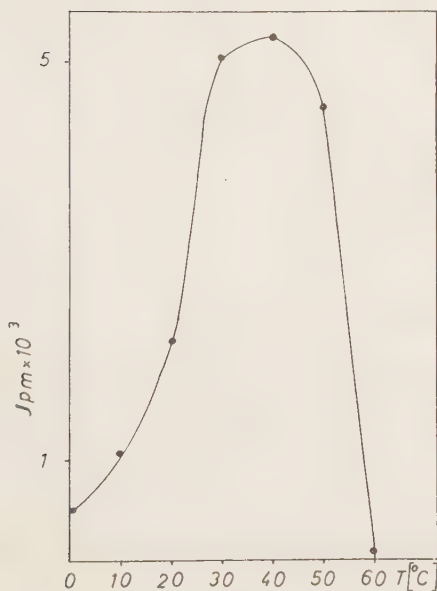


Abb. 7 Temperaturabhängigkeit der Initialaufnahme für Adenin.

(Aufnahmemessung mit $2,5 \mu\text{M}$ $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin, 5×10^6 Zellen/ml Ansatz, nach jeweils 10minütiger Vortemperaturierung der Zellen. Inkubationszeit 1 min).

keit für Adenin mit steigender Temperatur bis zu einem Maximalwert bei 40°C und fällt dann steil ab. Oberhalb von 60°C findet keine meßbare Aufnahme mehr statt. Das gleiche trifft auch für Guanin und Hypoxanthin zu. Die aus dem Arrhenius-Diagramm (s. Abb. 8) in einer Reihe von Experimenten ermittelten Aktivierungsenergien liegen bei (15 ± 3) kcal/Mol. Damit befinden sich sowohl Temperaturoptimum als auch Akti-

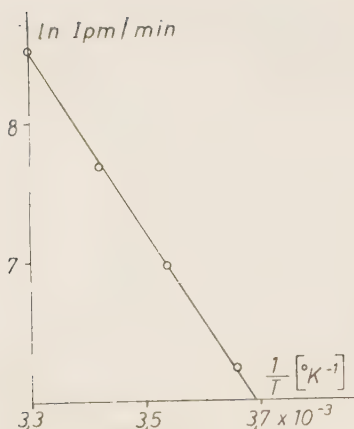


Abb. 8 Darstellung der Werte
von Abb. 7 im Arrhe-
niusdiagramm.

vierungsenergie der Aufnahme in einem für enzymkatalysierte Reaktionen charakteristischen Bereich (s. z. B. DIXON und WEBB 1964). Das legt die Vermutung eines katalysierten Transports für die drei Purinbasen nahe.

3.4 Die initiale Aufnahmegeschwindigkeit als Funktion der externen Substrat-Konzentration

Wie bereits erwähnt wurde, sollen bei Vorliegen katalysierten Transports aufgrund der begrenzten Anzahl vorhandener "Carrier"-Moleküle ein Sättigungswert in der initialen Aufnahmegeschwindigkeit v mit steigender externer Substratkonzentration s erreicht werden. Das ist für die drei Basen Adenin, Hypoxanthin und Guanin innerhalb eines Konzentrationsbereiches von $0.5 - 30 \mu$ der Fall (als Beispiel siehe Abb. 9).

Xanthin wird unter den gleichen Kultivierungs- und Meßbedingungen nicht signifikant aufgenommen.

Unter der Voraussetzung, daß zu Beginn der Versuche die interne Sub-

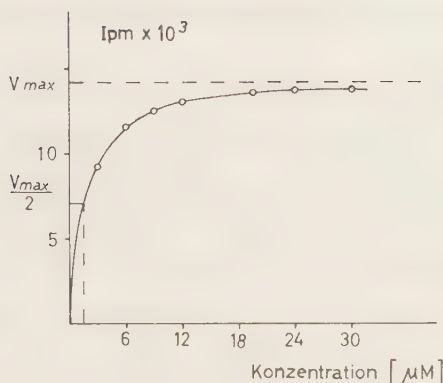
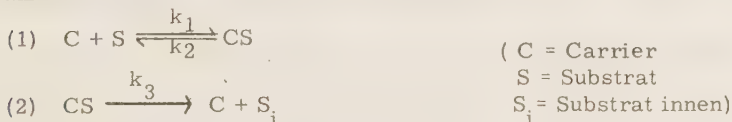


Abb. 9 Einfluß der Außenkonzentration auf die Initialauf-
nahmerate von Guanin.
 (Ansatz: 2×10^7 Zellen/ml, Inkubationszeit
 1 Minute)

stratkonzentration vernachlässigbar klein ist, sollte v als Funktion von s der Michaelis-Menten-Beziehung gehorchen, da sich kinetisch betrachtet der Transportvorgang wie eine Enzymreaktion im einfachsten Falle in zwei Teilreaktionen zerlegen läßt.



Nach dem Modell von PARDEE (s. Seite 7) würde Reaktion (1) den Recognition-Vorgang, Reaktion (2) die Folge Translokation $\longrightarrow$ Release $\longrightarrow$ Recovery integral beschreiben.

Mit den für die Kinetik enzymkatalysierter Reaktionen üblichen Einschränkungen (steady state-Annahme, s. z. B. DIXON und WEBB 1964) ergibt sich

aus (1) und (2) für die Aufnahmegeschwindigkeit v :

$$(3) \quad v = \frac{V_{\max} \cdot s}{K_m + s},$$

wobei $V_{\max}$ die maximale Aufnahmegeschwindigkeit, proportional den vorhandenen Carrier-Molekülen und damit der Zellzahl ist, und K_m die externe Substratkonzentration der halbmaximalen Aufnahmegeschwindigkeit wiedergibt ($K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1}$).

Verläuft der Prozess (2) wesentlich langsamer als der Recognitionvorgang ($k_3 \ll k_2$), so kann der reziproke Wert von K_m als ein Maß für die Affinität des untersuchten Substrats zum Transport-System gelten.

Gleichung (3) läßt sich durch verschiedene Transformationen in eine für die Auswertung experimenteller Daten geeignetere Geradengleichung überführen. In dieser Arbeit wird die auf HANES (1932) zurückgehende Umformung $s/v = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{1}{V_{\max}} \cdot s$ benutzt.

Trägt man s/v gegen s auf, so gibt einem der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse den negativen Wert von K_m , ihre Steigung $1/V_{\max}$.

Die so erhaltenen K_m - und $V_{\max}$ -Werte für die drei Basen Adenin, Guanin und Hypoxanthin sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die maximale Aufnahmerate kann in Abhängigkeit von der Präinkubation in Glucose-Citrat-Puffer, dem Zustand der Zellen und der Temperatur stark schwanken, ohne den K_m -Wert wesentlich zu beeinflussen.

TABELLE 1

Base	K_m (μM)	V_m^* (10^{-17} Mol/Zelle · min)
Adenin	0.65 ± 0.15	3 ± 0.5
Guanin	1.5 ± 0.2	1.6 ± 0.5
Hypoxanthin	2.0 ± 0.2	1.3 ± 0.5

* Durchschnittlicher Wert nach 2 Stunden Präinkubation in Glucose-Citrat-Puffer bei 25°C.

3.5 Untersuchungen zur Inhibition des Purin-Transports

3.5.1 Wechselseitige Hemmung der natürlichen Purinbasen untereinander

Versuche mit Guanin-auxotrophen *Saccharomyces*-Mutanten haben gezeigt, daß diese Zellen zwar in der Lage sind, auf Guanin-haltigem Medium zu wachsen, daß jedoch die gleichzeitige Gegenwart von Adenin den wachstumsfördernden Effekt des Guanins unterdrücken kann (REICHERT und WINTER 1972). Wie aus Abb. 10 hervorgeht, nimmt die exponentielle

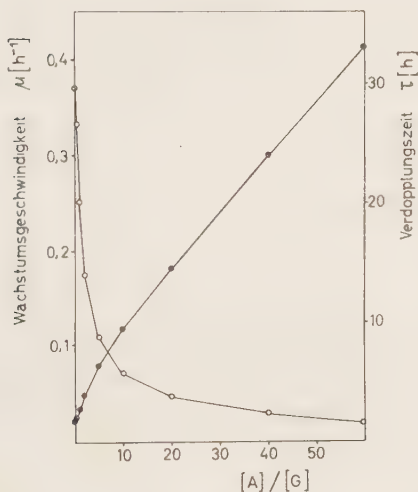


Abb. 10 Abhängigkeit der Wachstumsgeschwindigkeit der Guanin-auxotrophen Mutante Q 1230/1 vom Konzentrationsverhältnis Adenin/Guanin im Medium. (Aufzucht bei $T = 30 \pm 1^\circ C$ in GYNP, 0.1 mM Guanin und variable Konzentrationen Adenin enthaltend).

Wachstumsgeschwindigkeit ($\mu = \ln 2 / \text{Zellverdopplungszeit}$) bei gleichbleibender Guaninkonzentration mit steigender Adeninkonzentration rasch ab; die Zellverdopplungszeit τ nimmt dementsprechend schnell zu. Dieser Effekt läßt sich erklären, wenn man ein gemeinsames Transportsystem für Adenin und Guanin annimmt, zu dem Guanin aufgrund seines doppelt so hohen K_m -Wertes eine geringere Affinität besitzt. Sollte die Erklärung eines gemeinsamen Transportsystems zutreffen, so müßten die einzelnen Basen wechselseitig ihre Aufnahme in die Zelle kompetitiv hemmen. Kinetisch betrachtet heißt das (vgl. DIXON und

WEBB 1964): gleiche maximale Aufnahmegeschwindigkeit $V_{\max}$, aber einen um den Faktor $(1 + i/K_i)$ erhöhten K_m -Wert für die Aufnahme der markierten Base in Gegenwart einer zweiten nicht markierten Base (Konzentration i), K_i ist die Inhibitionskonstante der nicht markierten Base, die sich aus dem scheinbaren K_m bei gegebenem i und dem wahren K_m bei $i = 0$ berechnen läßt. Liegt ein gemeinsames Transportsystem für mehrere Basen vor, so sollten die K_m - und K_i -Werte der von ihm erkannten Basen miteinander identisch sein, da sie als Substrat und als Inhibitor die gleiche Affinität zum Transportsystem besitzen. Abb. 11 zeigt als Beispiel die Hemmung der Hypoxanthin-Aufnahme durch

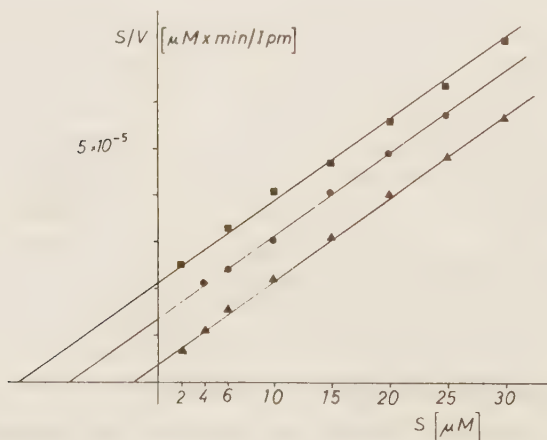


Abb. 11 Darstellung der Konzentrationsabhängigkeit der Initialaufnahmerate von Hypoxanthin (▲) und von Hypoxanthin in Gegenwart inaktiven Guanins (●) und Adenins (■) im HANES-Diagramm.
(näheres siehe Text).

Adenin und Guanin. Beide Hemmsubstrate haben die gleiche Endkonzentration ($4 \mu\text{M}$) im Inkubationsmedium, Guanin erhöht den K_m -Wert von $2 \mu\text{M}$ auf $7,6 \mu\text{M}$, Adenin auf $12 \mu\text{M}$, $V_{\max}$ bleibt unverändert.

In Tabelle 2 sind die mittleren K_m - und K_i -Werte aus verschiedenen Versuchen für die drei Basen Adenin, Guanin und Hypoxanthin zusammengefaßt.

TABELLE 2

Substrat \ Inhibitor			
	Adenin	Guanin	Hypoxanthin
Adenin	<u>0.65</u>	1.4	2.2
Guanin	0.7	<u>1.5</u>	1.9
Hypoxanthin	0.8	1.4	<u>2.0</u>
Spaltenmittelwert	0.72	1.43	2.0

Die unterstrichenen Zahlen geben die K_m -Werte (μM), die übrigen Zahlen die Inhibitor-Konstanten (μM) der im Kopf vermerkten Purinderivate für die Aufnahme der in den Zeilen angegebenen Basen wieder. Wie aus dieser Aufstellung zu ersehen ist, unterstützen die kinetischen Daten klar die Vorstellung von einem gemeinsamen Transportsystem für Adenin, Guanin und Hypoxanthin. Da der inhibitorische Effekt von Xanthin innerhalb der Fehlergrenze liegt (s. Tabelle 3), kann geschlossen werden, daß diese natürliche Purinbase nicht über das gemeinsame System in die Zelle gelangt.

Ergänzend hierzu sei vermerkt, daß J. POURQUIÉ (pers. Mitteilung)

aus *Schizosaccharomyces pombe* eine offensichtlich "Permease"-geschädigte Mutante isoliert hat, die weder Adenin noch Guanin noch Hypoxanthin, wohl aber - nach geeigneter Vorbehandlung - (Anzucht in einem Medium niedriger NH_4^+ -Konzentration) Xanthin aufnehmen kann.

3.5.2 Hemmung durch Basenanaloga

Die im vorhergehenden Abschnitt skizzierte wechselseitige Hemmung der natürlichen Basen untereinander wurde durch einen Orientierungsversuch mit einer Reihe von in C_2 - und C_6 -Stellung des Purinringsystems substituierten Basenanaloga ergänzt. Es wurde die initiale Aufnahmegeschwindigkeit von $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Guanin ($20\text{ }\mu\text{M}$) in Gegenwart der in Tabelle 3 wiedergegebenen Inhibitoren ($20\text{ }\mu\text{M}$) gemessen.

TABELLE 3

Nr.	-Purin	% Hemmung	K_i (μM)
1	6-(NH_2)-	62	0.85
2	6-(OH)-	46	1.64
3	6-(NH-N)-	32	3.0
4	6-(CN)-	24	4.4
5	2,6-(NH_2) ₂ -	23	4.7
6	6-(Cl)-	9	14.
7	6-(SH)-	5	27.
8	6-( -NH)-	5	27.
9	2,6-(OH) ₂ -	5	27.

Die in der Tabelle angegebenen K_i -Werte sind unter Annahme kompetitiver Hemmung nach

$$K_i = \frac{i}{1 + s/K_m} \cdot \frac{v}{v-v'}$$

mit v der initialen Aufnahmegeschwindigkeit in Abwesenheit eines Inhibitors,
 v' der initialen Aufnahmegeschwindigkeit in Gegenwart des Inhibitors,
 i der Inhibitorkonzentration ($20 \mu\text{M}$),
 s der Guaninkonzentration ($20 \mu\text{M}$),
 $K_m = 1.5 \mu\text{M}$ für Guanin
 berechnet worden.

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, stimmen die derart für Adenin (1) und Hypoxanthin (2) ermittelten K_1 -Werte annähernd mit den exakteren des vorigen Abschnittes überein. Der Hemmeffekt von 6-Mercaptopurin (7), 6-Anilinopurin (8) und Xanthin (9) liegt innerhalb der Fehlergrenze der Versuchsanordnung. Purin selbst, Ribonukleoside und -nukleotide und Pyrimidine hemmen nicht.

Unterstellt man, daß die Annahme kompetitiver Hemmung auch für die hierzu nicht näher geprüften Basen der Tabelle zutrifft und daß der reziproke K_1 -Wert ein Maß für die Affinität der einzelnen Base zum Transportsystem darstellt, so kann man vermuten, daß besonders die NH_2 - und OH -Gruppen in C_6 -Stellung erkannt werden. Die in C_6 -Stellung befindlichen Substituenten hemmen oder fördern die Bindung an das Transportsystem, je nachdem, mit welcher Gruppe in C_6 sie in Verbindung stehen.

3.5.3 Hemmung durch "prefilling"

CUMMINS und MITCHISON stellten 1967 bei der Untersuchung der Adenin-Aufnahme durch *Schizosaccharomyces pombe* fest, daß eine Präinkubation exponentieller Zellen in relativ hohen Konzentrationen nicht markierten Adenins zu einer nicht-kompetitiven Hemmung der anschließend gemessenen Aufnahmegeschwindigkeit für $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin führt. Dieses Ergebnis ist auch für *Saccharomyces* reproduzierbar (s. Abb. 12). Innerhalb von 10 Minuten sinkt die Initialaufnahmerate für $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin auf 63 % des Anfangswertes. Da eine längere Inkubation die Aufnahmegeschwindigkeit nicht mehr beeinflusst, scheint damit die maximale Inhibierbarkeit durch Adenin-prefilling erreicht zu sein.

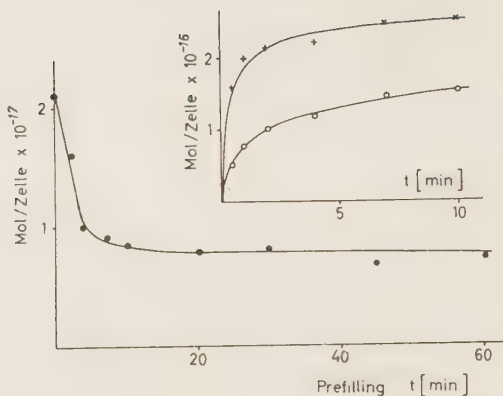


Abb. 12 Wirkung des Adenin-Prefilling auf die Adenin-Aufnahme in Zellen der exponentiellen Wachstumsphase.

(Zum Zeitpunkt 0 wurden 3 Stunden alte Zellen in GYNP + 0.065 mM Adenin bzw. als Kontrolle in GYNP inkubiert und in Intervallen die Initialaufnahmerate mit $2 \mu\text{M}$ $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin getestet.

Oben rechts ist die Adenin-Aufnahme der Zellen nach 30 Minuten Prefilling (o) und der Kontrollzellen (+) wiedergegeben).

In einem analogen Experiment wurde der prefilling-Effekt von inaktivem Guanin, Adenin und Hypoxanthin auf die $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Guanin-Aufnahme untersucht. Unabhängig von der zur Präinkubation verwendeten Purinbase ist auch hier nach 30 Minuten die initale Aufnahmerate um 60-75 % reduziert. Prefilling mit Pyrimidinbasen hat keinen Einfluß auf die Purinaufnahme.

Eine kinetische Analyse am Beispiel der Adenin-Aufnahme nach Adenin-prefilling zeigt, daß - wie bei CUMMINS und MITCHISON - eine nicht-kompetitive Hemmung (K_m unverändert, $V_{\max}$ reduziert) vorliegt (s. Abb. 13). CUMMINS und MITCHISON erklären diesen Effekt mit

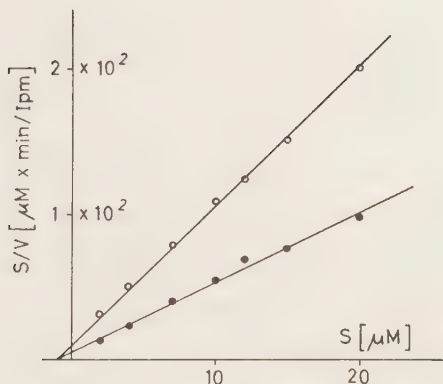


Abb. 13 Konzentrationsabhängigkeit der Adenin-Initialaufnahme-rate nach 30 min Prefilling mit 0.2 mM Adenin (o) und ohne Prefilling (•), dargestellt im HANES-Diagramm.

der intrazellulären Akkumulation eines oder mehrerer Purinderivate, die die Adenin-Aufnahme durch Blockierung von Carrier-Molekülen regulieren.

Es sei darauf hingewiesen, daß bei dieser Art von Experimenten weniger der Hemmeffekt durch die eigene Base von Bedeutung ist als vielmehr die Tatsache, daß zum Beispiel prefilling mit Adenin die Guanin-Aufnahme inhibiert. Nach dem Counterflow-Prinzip sollte man aber eine Aktivierung erwarten. Eine Hemmung durch prefilling mit der eigenen Base ist verständlich, da unter diesen Bedingungen ja keine "Anfangs"-geschwindigkeit mehr gemessen werden.

3.5.4 Hemmung durch Energiegifte

Der Vollständigkeit halber sei vermerkt, daß sich auch die Aufnahme der hier untersuchten Purinbasen wie eine Reihe bekannter Transportsysteme durch Energiegifte hemmen läßt. So wird in Gegenwart von 1mM

2,4 - Dinitrophenol, einem wirksamen Entkoppler der oxydativen Phosphorylierung, die Gesamtmenge akkumulierbarer Radioaktivität in der Zelle auf 17 % reduziert. Mit der bisher verwandten Methode kann jedoch nicht entschieden werden, ob dabei das Transportsystem selbst oder weitermetabolisierende Reaktionen betroffen sind.

3.6 Versuche zur intrazellulären Akkumulation von Purinbasen

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß

1. Purinbasen durch katalysierten Transport in die Hefezellen gelangen,
2. den drei Basen Adenin, Hypoxanthin und Guanin ein gemeinsames Transportsystem zukommt,
3. die Purinaufnahme in stoffwechselaktiven Zellen weitaus schneller abläuft als in ruhenden (Abhängigkeit der Aufnahmegeschwindigkeit von der Wachstumsphase).

Mit den bisherigen Ergebnissen kann jedoch nicht entschieden werden, ob es sich beim Purin-Transport um ein aktives System handelt. Als ein erster Hinweis hierfür könnte eine über die Außenkonzentration hinaus erfolgende intrazelluläre Akkumulation der Basen angesehen werden.

Zur Prüfung dieser Frage wurden stationäre Zellen nach zweistündiger Präinkubation in Glucose-Puffer in einer Hypoxanthin-Glucose-Lösung resuspendiert und in Intervallen sowohl die Hypoxanthin-Abnahme im externen Milieu als auch der Hypoxanthin-Gehalt in den lyophilisierten Zellextrakten enzymatisch ermittelt. Daneben wurde auch der intrazelluläre Inosin-pool gemessen. Wie aus Abb. 14 hervorgeht, nehmen mit sinkender Hypoxanthin-Konzentration im Medium Hypoxanthin und Inosin in den Zellextrakten kontinuierlich zu. Für Inosin wurde nur die relative Pool-Zunahme abzüglich der Anfangspool-Konzentration von 1×10^{-16} Mol/Zelle aufgetragen.

Aus dem gemessenen Hypoxanthin-Gehalt pro Zelle ist eine Abschätzung der intrazellulären Hypoxanthin-Konzentration möglich. Nach REICHERT

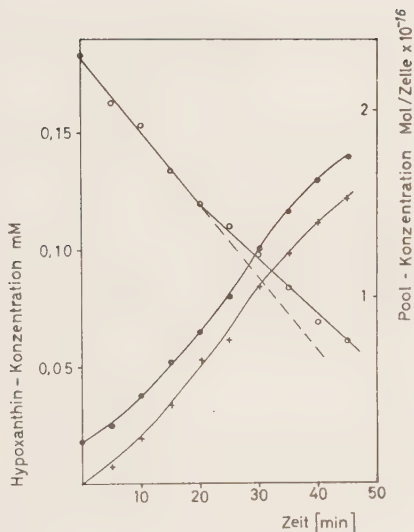


Abb. 14

Hypoxanthin-Abnahme im

Medium in Abhängigkeit von der Zeit (o) bei gleichzeitiger Messung des Inosin (+)- und Hypoxanthin(●)-pools in der Zelle.

(Anfangskonzentration der Hypoxanthin-Lösung 0.18 mM, Näheres siehe Text).

(1969) liegt das Zellvolumen des tetraploiden Stammes 2200 in der Größenordnung von $150\mu^3$. Nimmt man an, daß 80 % dieses Volumens wässrige Phase darstellen, so ergibt sich ein zelluläres Flüssigkeitsvolumen von $120\mu^3$ ($= 1,2 \cdot 10^{-13}$ l). Berechnet man mit Hilfe dieses Wertes und den in Abb. 14 wiedergegebenen Daten das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer Hypoxanthin-Konzentration, so erhält man in Abhängigkeit von der Zeit die in Abb. 15 dargestellte Akkumulationskurve. Nach 45 Minuten Inkubation in einer 0.18 mM Hypoxanthin-Lösung wird eine gut 20fache Akkumulation gegenüber der dann herrschenden Außenkonzentration erreicht.

Weitaus stärker noch ist das Akkumulationsverhalten der Zellen nach Guanin-Aufnahme ausgeprägt. Abb. 16 zeigt die Abnahme des Guanin-Gehaltes im Medium und die Entwicklung des intrazellulären

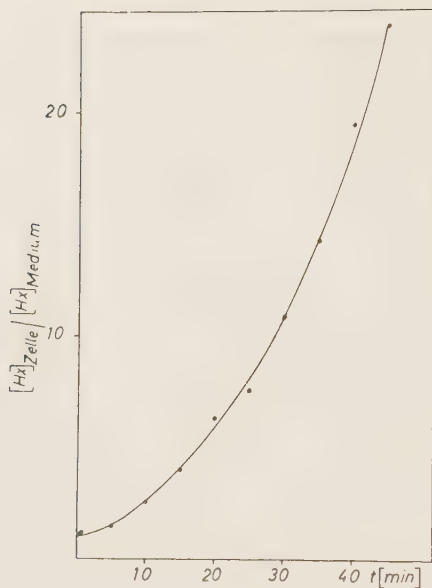


Abb. 15 Verhältnis der intrazellulären zur extrazellulären Hypoxanthinkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit unter den Versuchsbedingungen von Abb. 14.

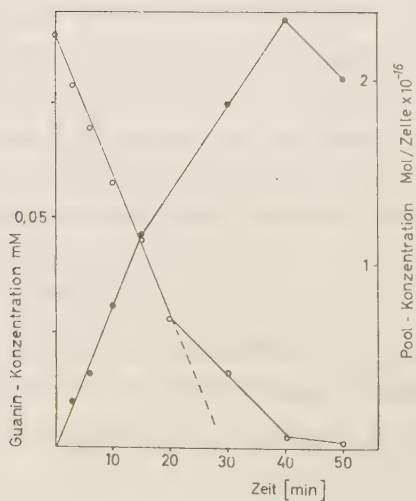


Abb. 16
Guanin-Abnahme im Medium (o) und intrazellulärer Guanin-pool (o) in Abhängigkeit von der Zeit.
(Anfangskonzentration der Guanin-Lösung 0,09 mM, Näheres siehe Text).

Guanin-pools in Abhängigkeit von der Inkubationszeit unter analogen Versuchsbedingungen. Im Gegensatz zum vorhergehenden Versuch ist hier keine wesentliche Ausbildung des entsprechenden Nukleosid-pools (Guanosin) zu beobachten (nicht dargestellt). Berechnet man wiederum das Verhältnis zwischen intra- und extrazellulärer Basenkonzentration, so beträgt nach 50 Minuten Inkubation in einer 0.09 mM Guanin-Lösung die intrazelluläre Akkumulation der freien Base etwa 1400fach (siehe Abb. 17).

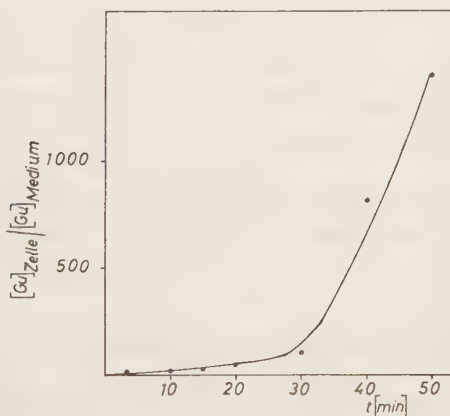


Abb. 17 Verhältnis der intrazellulären zur extrazellulären
Guaninkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit
unter den Versuchsbedingungen von Abb. 16.

Für Adenin ließ sich das Experiment in dieser Form wegen des Fehlens eines enzymatischen Nachweises nicht durchführen. Es wurden jedoch Zellextrakte nach Adenin- und nach Hypoxanthin-Aufnahme auf einer Ionenaustauscher-Säule getrennt (s. Abschnitt 2). Unabhängig von der extern angebotenen Base wurde im Chromatogramm nur ein Basen-peak, nämlich der von Hypoxanthin ausgebildet. Dieses unterschiedliche Verhalten der drei Purinbasen läßt eine Akkumulation durch unspezifische Adsorption an Zellkomponenten, wie sie etwa MICHELER und LOCHMANN (1974) für Thio-pyronin finden, unwahrscheinlich erscheinen. Dieser Farbstoff bindet sich intensiv an Nukleinsäuren und Proteine, dennoch ist nur eine maximal 3fache intrazelluläre Akkumulation zu messen.

Zusammenfassend soll noch einmal hervorgehoben werden, daß - obwohl die drei Purine Adenin, Hypoxanthin und Guanin über ein gemeinsames Transportsystem in die Zelle gelangen - nur Hypoxanthin und Guanin wesentlich über ihre Außenkonzentration in der Zelle angereichert werden können.

Eine Interpretation dieses widersprüchlichen Befundes soll der Diskussion vorbehalten bleiben, er muß bei der Erarbeitung eines Modells zum Purintransport berücksichtigt werden.

3.7 Untersuchungen zur Energieabhängigkeit des Purin-Transports

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, daß zwei der drei untersuchten Purinbasen in der Zelle aktiv akkumuliert werden. Daraus ist zu entnehmen, daß metabolische Energie durch das Transportsystem verbraucht wird.

Die früheren Untersuchungen (Abschnitt 3.1 und 3.2, Abb. 6) haben ergeben, daß stationäre gegenüber exponentiellen Zellen nur mit geringer Geschwindigkeit Purinbasen aufnehmen können. Werden jedoch stationäre Zellen in Glucose-Puffer präinkubiert, so ist nach 10 bis 20 Minuten eine kontinuierliche Steigerung der initialen Aufnahme zu beobachten. Sie erreicht einen Maximalwert nach 60 bis

120 Minuten. Da bei diesen Versuchen auch das Aufnahmemedium 0.2 M Glucose enthielt, bleibt zu prüfen, ob durch die Präinkubation nur eine Stimulation der Initialaufnahme, beispielsweise durch die Aktivierung bestimmter Enzyme erzielt wird, oder ob genügend Energie intrazellulär gespeichert werden kann, um eine maximale Akkumulation von radioaktiv markierten Purin-Derivaten in den Zellen auch ohne externe Energiezufuhr zu gewährleisten.

Hierzu wurde die Präinkubation stationärer Zellen zu verschiedenen Zeiten abgebrochen und ihr Aufnahmeverhalten in An- und Abwesenheit von Glucose über 30 Minuten verfolgt. Wie aus Abb. 18 hervor-

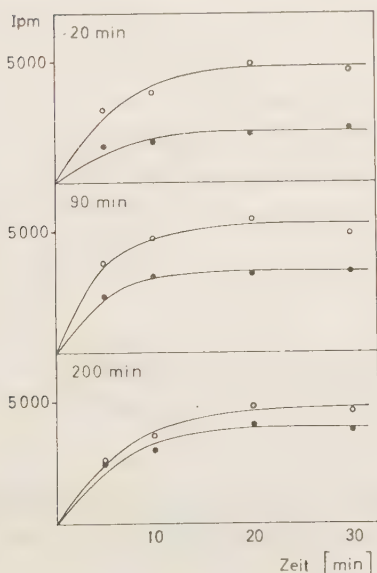


Abb. 18

Hypoxanthin-Aufnahme
in Abhängigkeit von Glucose im Medium.

(Nach den oben links angegebenen Zeiten der Präinkubation in Glucose-Puffer, wurde die Aufnahme von $8\text{-}^{14}\text{C}$ -Hypoxanthin ($15\text{ }\mu\text{M}$, $2 \times 10^6\text{ Imp}/\mu\text{Mol}$) in Glucose-Puffer (o) und in Puffer (●) gemessen).

geht, ist nach kurzen Präinkubationszeiten noch ein Nachfluß an Glucose während der Hypoxanthin-Aufnahme notwendig, um einen ma-

ximalen Wert aufgenommener Radioaktivität zu erreichen. Erst nach 200 Minuten Präinkubation scheint soviel Energie gespeichert zu sein, daß die Abwesenheit von Glucose im Aufnahmemedium ohne wesentliche Auswirkung bleibt.

Es stellt sich die Frage, in welcher Form diese für den Transport notwendige Energie gespeichert wird.

Eine der denkbaren Möglichkeiten ist die Akkumulation energiereicher Moleküle mit fortschreitender Präinkubationszeit. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden die Poolkonzentrationen von ATP und Phosphoenolpyruvat (PEP) sowie von Glucose-6-Phosphat als der aktivierten Form von Glucose zu verschiedenen Zeiten der Präinkubation gemessen (s. Abb. 19).

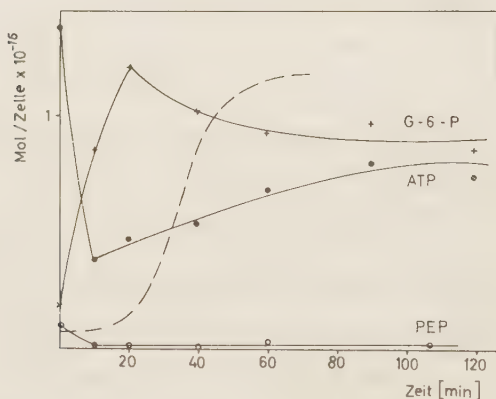


Abb. 19 Intrazelluläre Konzentration von Glucose-6-Phosphat, PEP und ATP während der Präinkubation stationärer Zellen.

(Zum Vergleich wurde die Kurve der Initialaufnahme-raten für Adenin in Abhängigkeit von der Präinkubation (Abb. 6) gestrichelt eingezeichnet).

Entgegen unseren Erwartungen nehmen innerhalb der ersten 10 Minuten die Pool-Konzentrationen von ATP und PEP stark ab, um sich auf ein annähernd konstantes Niveau, das unterhalb der jeweiligen Anfangskonzentration liegt, einzupendeln.

Es bleibt natürlich die Möglichkeit, daß im Gegensatz zu den hier untersuchten, andere energiereiche Moleküle intrazellulär akkumuliert werden, wobei das Phosphoribosylpyrophosphat durch seine Bedeutung für die Weitermetabolisierung der Basen in der Zelle eine besondere Rolle spielen könnte.

Eine Poolbestimmung dieser Substanz war wegen des Fehlens eines geeigneten Nachweissystems nicht durchführbar.

Die für ATP und PEP erzielten Ergebnisse lassen es jedoch prinzipiell fraglich erscheinen, ob die Höhe der pool-Niveaus an energiereichen Substanzen überhaupt für den Transportprozess ausschlaggebend sind. Eine plausible Alternative hierzu wäre, daß die Zellen aufgrund eines hohen Potentials an gespeicherter Glucose (z. B. in Form von Glykogen) in der Lage sind, verbrauchte energiereiche Moleküle auch bei einem niedrigen aktuellen pool-Niveau, schnell zu regenerieren.

Zusammenfassend kann der Einfluß der Präinkubation auf folgende einander überlagernde Effekte zurückgeführt werden:

1. Stimulierung der Initialaufnahme, wahrscheinlich durch die Aktivierung bestimmter Enzyme, die nach 60 bis 120 Minuten abgeschlossen ist. Für eine maximale Aufnahme, sowohl in Hinblick auf die Anfangsgeschwindigkeit als auch auf den Endwert der Akkumulation, ist jedoch ein externes Energieangebot notwendig.
2. Intrazelluläre Speicherung von Energie, möglicherweise in Form von Glykogen, die erst nach etwa 200 Minuten dazu führt, daß der

Aufnahmeprozess von einer externen Energiequelle unabhängig ist.

Es stellt sich nun die Frage, an welchem Schritt des Modells von PAR-DEE (vgl. Abb. 2) die Energie angreift. Dieses Problem ist mit in vivo Versuchen praktisch nicht lösbar, es sei denn, daß das Transportprotein während des Recovery-Schrittes unter Verbrauch eines energiereichen Moleküls in eine Konformation mit höherer Affinität zu den Substraten umgewandelt werden kann. Unter diesen Bedingungen sollten sich die K_m -Werte für die Aufnahme der Basen in An- und Abwesenheit von metabolischer Energie unterscheiden. Wie aus Abb. 20 hervor-

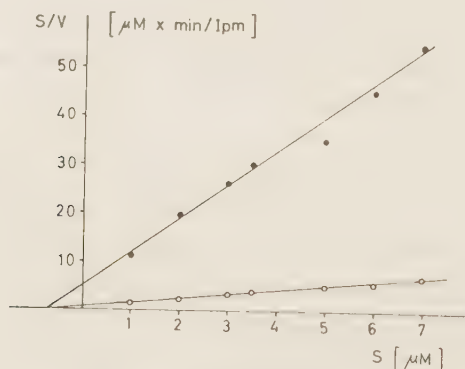


Abb. 20 Konzentrationsabhängigkeit der Initialaufnahme von Adenin in präinkubierte Zellen (o) und in nicht präinkubierte Zellen (●), dargestellt im HANES-Diagramm.

geht, ist das jedoch nicht der Fall. Es unterscheiden sich allein die $V_{\max}$ -Werte. Die Präinkubation in Glucose-Puffer führt also nicht zu einer Veränderung der Affinität des Transportsystems zum Substrat.

3.8 Untersuchungen zum Efflux aufgenommenen Purinbasen

Die bisher beschriebenen Untersuchungen behandelten die Aufnahme von Purinbasen unter verschiedenen Aspekten. Die Möglichkeit, daß Zellen intern akkumulierte Basen auch nach außen abgeben können, wurde nicht berücksichtigt. Es ist aber bekannt, daß immer dann, wenn von Organismen die zelluläre Diffusionsbarriere durch Entwicklung eines Transportsystems durchbrochen wurde, der Transportvorgang auch in umgekehrter Richtung, also von innen nach außen, ablaufen kann. Dieser Prozess wird Efflux genannt.

Zu einer ersten Charakterisierung des Efflux wurden zwei Stunden in Glucose-Puffer präinkubierte Zellen in 0,05 mM 8- ^{14}C -Adenin in Gegenwart von 0,2 M Glucose inkubiert und die Änderung der Radioaktivität im Außenmedium in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt. Wie aus Abbildung 21 zu ersehen ist, werden innerhalb der ersten 4 Minuten

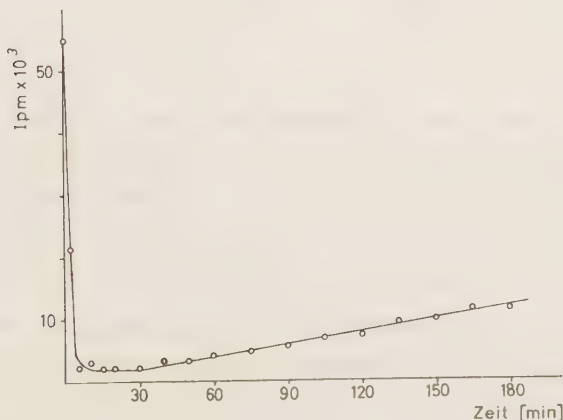


Abb. 21 Aufnahme- und Efflux-Messung in Abhängigkeit von der Zeit mit ^{14}C -Adenin.
(Näheres siehe Text).

96 % des Adenins in die Zellen inkorporiert. Daran anschließend nimmt die Radioaktivität im Medium jedoch wieder zu, wenn auch mit sehr geringer Geschwindigkeit. Die enzymatische Bestimmung des Hypoxanthin-Gehalts im Medium nach 180 Minuten ergab eine Konzentration von $11 \mu\text{M}$. Dieser Wert ist praktisch mit der Konzentration der abgegebenen Radioaktivität identisch. Es darf daraus geschlossen werden, daß nach der Aufnahme von Adenin hauptsächlich Hypoxanthin exkretiert wird. Dieses Ergebnis unterstützt den Befund des Abschnittes 3.6, wo gezeigt wird, daß aufgenommenes Adenin als freie Base in Form von Hypoxanthin intrazellulär akkumuliert wird. Vergleicht man bei diesem Versuch die In- mit der Efflux-Geschwindigkeit, so ergibt sich ein Verhältnis von 13.000 Ipm/min zu 70 Ipm/min. Damit liegt die Effluxrate in einem Bereich von $\sim 0,5 \%$ der Influxrate.

Um weitere Informationen über das Efflux-Verhalten der Zellen zu sammeln, wurden Temperatur- und Energieabhängigkeit geprüft. Für diese Versuche wurden zwei Stunden in Glucose-Puffer präinkubierte Zellen in $0,05 \text{ mM } 8\text{-}^{14}\text{C}$ -Adenin in Gegenwart von $0,2 \text{ M}$ Glucose für 30 Minuten inkubiert.

Für den Versuch zur Demonstration der Temperaturabhängigkeit des Efflux betrugen die Inkubationstemperaturen 20° und 30°C . Nach der 30minütigen Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und in entsprechend vortemperiertem Glucose-Puffer resuspendiert. In Zeitintervallen wurde die Zunahme der Radioaktivität im Außenmedium gemessen. Wie aus Abbildung 22 zu ersehen ist, ist der Efflux— ebenso wie die Aufnahme—bei höherer Temperatur gesteigert. Um das analoge Verhalten von In- und Efflux zu verdeutlichen, wurde auch die Akkumulation der Radioaktivität während der Inkubation bei beiden Temperaturen gemessen und in der gleichen Abbildung wiedergegeben.

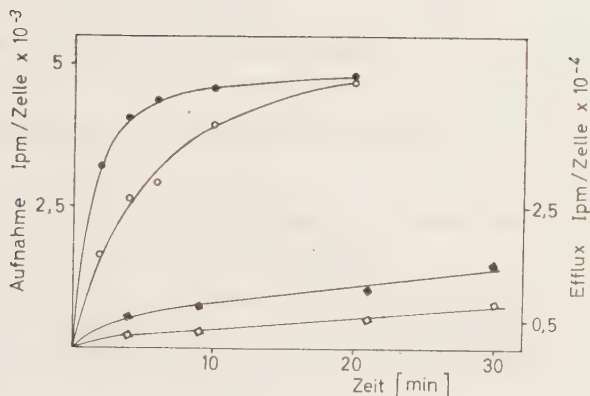


Abb. 22 Adenin-Aufnahme und Efflux bei 20°C (○, □) und bei 30°C (●, ■).

(Näheres siehe Text).

Für den Versuch zur Energieabhängigkeit des Efflux wurden die Zellen nach der Inkubation in der Adenin-Glucose-Lösung

a) in Puffer (vgl. Abschnitt 2),

b) in Glucose-Puffer resuspendiert

und die Abgabe von Radioaktivität in das Außenmedium über 60 Minuten geprüft. Das in Abbildung 23 dargestellte Ergebnis zeigt, daß durch

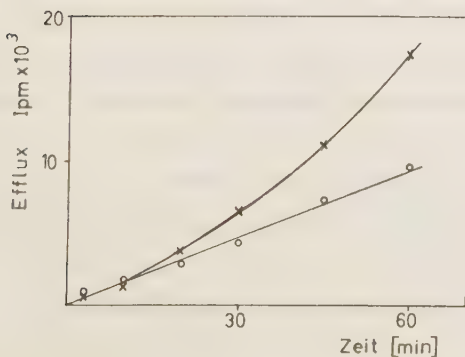


Abb. 23

Efflux nach 8-¹⁴C-Adenin-Aufnahme in Puffer (+) und in Glucose-Puffer (o).

den Entzug von externer Energie der Efflux mit der Zeit zunehmend aktiviert wird. Daraus geht hervor, daß zur Aufrechterhaltung eines Konzentrationsgradienten für die Basen von innen nach außen metabolische Energie notwendig ist.

Die hier beschriebenen Versuche (besonders die Energieabhängigkeit) zeigen, daß der Efflux nicht über reine Diffusion vonstatten gehen kann. Es ist daher anzunehmen, daß auch der Efflux über das Aufnahmesystem erfolgt.

4. ENTWICKLUNG UND DISKUSSION EINES PURIN-TRANSPORTMO- DELLS

Im ersten Überblick lassen sich die Versuchsergebnisse wie folgt zusammenfassen:

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt für die Nukleinsäurebasen Adenin, Hypoxanthin und Guanin ein spezifisches Transportsystem, dessen Aktivität vom physiologischen Zustand der Zellen (Wachstumsphase, Energiestoffwechsel) abhängt.

Da die drei Basen ihren Transport in die Zelle gegenseitig kompetitiv hemmen, werden sie offenbar von einem gemeinsamen Transportsystem, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität, gebunden.

Einem gemeinsamen Transportsystem scheint jedoch zu widersprechen, daß nur Hypoxanthin und Guanin, nicht aber Adenin als freie Base akkumuliert werden.

Eine fehlende Akkumulation von Adenin kann zunächst darauf zurückzuführen sein, daß diese Base im Gegensatz zu den beiden anderen besonders intensiv weitermetabolisiert wird. Das würde bedeuten, daß die Zellen von der Struktur ihres Transportsystems her zwar in der Lage sind, Adenin gegen ein Konzentrationsgefälle aufzunehmen, diese Fähigkeit unter unseren Versuchsbedingungen aber nicht auszunutzen brauchen. Betracht-

tet man jedoch das in Abbildung 1 (Seite 2) wiedergegebene Interkonversionsschema, so sollte dieses Argument in noch stärkerem Maße für Hypoxanthin wegen seiner zentralen Stellung im salvage pathway zutreffen.

Auffällig ist auch, daß gerade die beiden Basen, die intrazellulär akkumuliert werden, von einem gemeinsamen Enzym, der IMP-pyrophosphorylase, phosphoribolysiert werden, während dem nicht akkumulierten Adenin zur Umwandlung in das Nucleosid-5'-monophosphat ein eigenes Enzym zur Verfügung steht.

POURQUIÉ (1971, 1972) konnte nun für *Schizosaccharomyces pombe* zeigen, daß eine Mutante der IMP-pyrophosphorylase (*pur⁻1*) nur noch in stark reduziertem Maße Purinbasen aufnehmen kann, dafür aber erhebliche Mengen an Hypoxanthin in das Medium exkretiert. REICHERT und NAGY (unveröffentlichte Ergebnisse) fanden, daß die *pur-1* Mutante die Fähigkeit, Hypoxanthin intrazellulär zu akkumulieren, verloren hat. Für Guanin wurde dieser Sachverhalt noch nicht geprüft.

Im Gegensatz zur *pur-1* Mutante zeigt eine Mutation der AMP-pyrophosphorylase im Vergleich zum Wildtyp weder eine verminderte Aufnahmefähigkeit noch eine nennenswerte Exkretion von Purinbasen.

Diese Befunde deuten auf eine enge Wechselwirkung der IMP-, nicht aber der AMP-pyrophosphorylase mit dem Purin-Transportsystem hin.

Auf eine generelle Bedeutung von Pyrophosphorylasen für den Nukleinsäure-Basentransport weisen auch folgende Untersuchungen hin. GRENSON (1969) fand eine erhebliche Reduktion des Uracil-Transports in einer UMP-pyrophosphorylase-Mutante von *Saccharomyces*. BERLIN und STADTMAN (1966) stellten bei *Escherichia coli* eine direkte Korrelation zwischen Purin-Aufnahmerate und der *in vitro* Aktivität der entsprechenden Pyrophosphorylasen fest. In weiteren Untersuchungen konnten HOCHSTADT-OZER und STADTMAN (1971 a, b, c) sogar nachweisen, daß die eng mit der Zellmembran assoziierte AMP-pyrophosphorylase direkt den

Adenin-Transport übernimmt. Darauf jedoch, daß die Verhältnisse bei Hefen nicht so einfach wie bei Bakterien sind, deutet neben unseren Untersuchungen bereits der Befund hin, daß bei *Schizosaccharomyces pombe* der K_m -Wert für die Phosphoribolysierung der Purinbasen 5-10mal höher als für deren Aufnahme ist (POURQUIÉ 1970, 1972; deGROODT 1969).

Die Entwicklung eines Modells für den Purin-Transport bei Hefen sollte somit von folgenden Prämissen ausgehen:

1. Das Transportsystem muß sowohl Adenin als auch Guanin und Hypoxanthin erkennen.
2. Die Asymmetrie des Transportsystems, die in den sehr großen Geschwindigkeitsunterschieden zwischen In- und Efflux zum Ausdruck kommt, muß berücksichtigt werden.
3. Eine Wechselwirkung der IMP-pyrophosphorylase mit dem Transportsystem zur Erklärung der Hypoxanthin- und Guanin-Akkumulation ist vorzusehen.

Diese drei Voraussetzungen werden von dem in Abbildung 24 wiedergegebenen, in Anlehnung an KOCH (1964, Galactosetransport bei Bakterien) entwickelten Modell erfüllt.

Nach diesem Modell wird die Bindung einer externen Base B an einen relativ unspezifischen Carrier C durch ein nur an der Außenseite der Membran vorhandenes Bindungsprotein* P katalysiert. Dieses Bindungsprotein sollte im Gegensatz zum Carrier eine hohe Affinität zu den betrachteten Substraten haben. Der Carrier-Basen-Komplex CB durchdringt die Membran und kann an deren Innenseite in freie Base und unbeladenen Carrier dissoziieren. Die unbeladenen wie die beladenen Carriermoleküle stehen an Innen- und Außenseite der Membran miteinander im

* entspricht in seiner Funktion der von KEPES und COHEN (1962) postulierten Permease. Da der Permease-Begriff heute jedoch häufig nicht mehr in seiner ursprünglichen Bedeutung benutzt wird, wird er im folgenden - soweit möglich - bewußt vermieden.

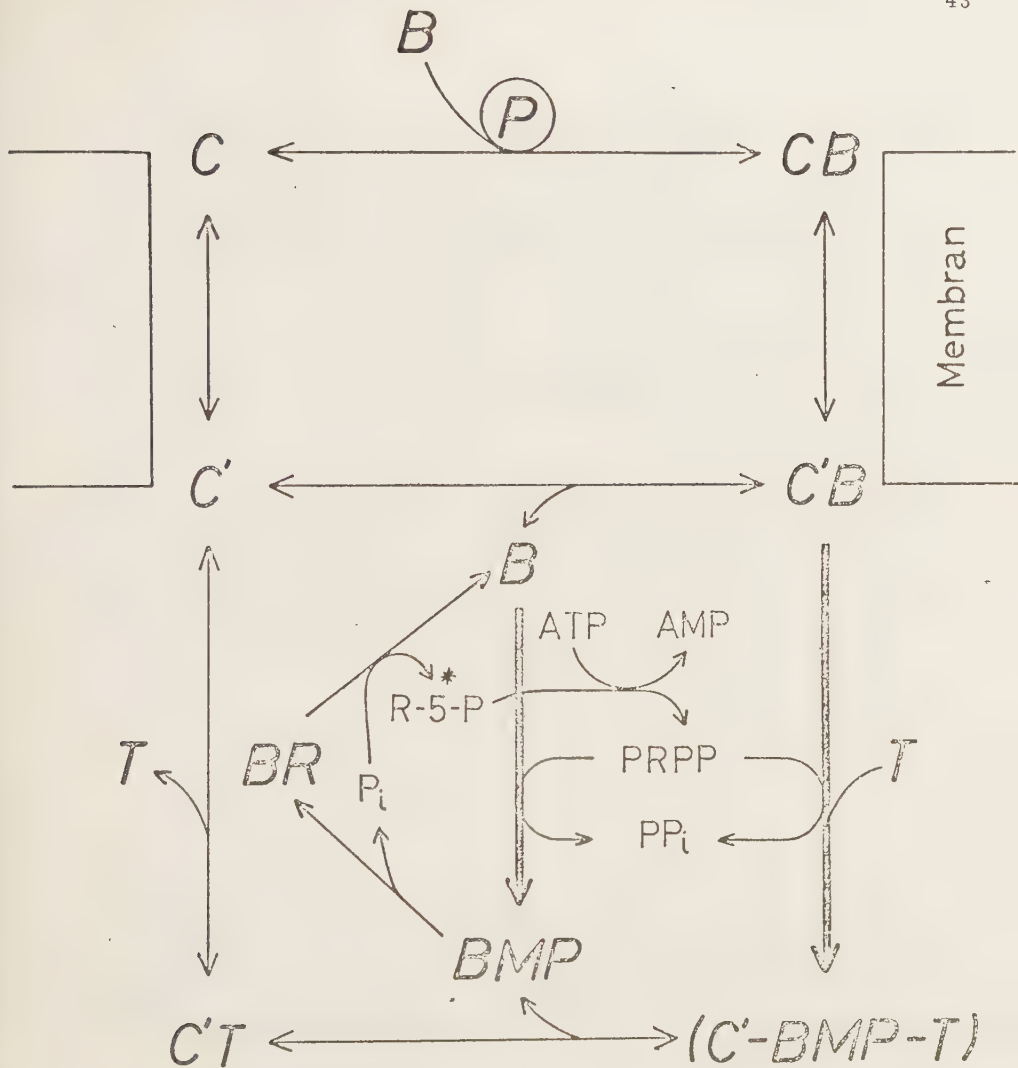


Abb. 24 Purin-Transportmodell (Näheres siehe Text).

C = Carrier außen, C' = Carrier innen,

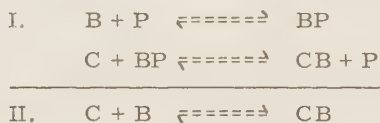
P = Bindungsprotein, T = IMP-pyrophosphorylase,

B = Base, BR = Nukleosid, BMP = Nukleosid-Mono-phosphat.

* Bei der Nucleosidphosphorylase-katalysierten Degradation von Nucleosiden entsteht zunächst R-1-P, das aber in einem weiteren enzymatischen Schritt zu R-5-P umgewandelt werden kann.

Gleichgewicht. Die intrazellulären freien Basen können mit Hilfe der entsprechenden Pyrophosphorylasen und unter Verwendung von PRPP in ihre Nukleosid-5'-monophosphate BMP umgewandelt werden. Diese wiederum können entweder weitermetabolisiert oder unter Katalyse durch 5'-Nukleotidasen und Nukleosidphosphorylasen zu ihren Nukleosiden BR und freien Basen abgebaut werden. Die Wiederherstellung der freien Basen über ihre Nukleosidmonophosphate und Nukleoside wird als "Recycling" bezeichnet.

Die Forderung nach einer Asymmetrie zwischen In- und Effluxgeschwindigkeiten wird also in unserem Modell dadurch realisiert, daß die Bindung der Substrate an den Carrier außen über ein spezifisches Bindungsprotein katalysiert wird, während das an der Innenseite der Membran nicht der Fall ist. Danach ist die Bildung von CB-Komplexen nach folgenden zwei Mechanismen möglich:



Neben der hier bevorzugten Teilung des eigentlichen Transportsystems in zwei Komponenten (P und C) ist ein asymmetrisches Verhalten auch dadurch erklärbar, daß ein singuläres Transportprotein bei Ausrichtung seines aktiven Zentrums von außen nach innen dieses zu geringerer Affinität verändert.

Nimmt man jedoch an, daß der Pyrimidin-Transport analog zum Purin-Transport erfolgt (dafür spricht z. B. dessen Pyrophosphorylase-Abhängigkeit vgl. Seite 41), so lassen sich von GRENSON (1969) erzielte Ergebnisse einfacher mit dem ersten Konzept interpretieren. Die Autorin hatte gefunden, daß Pyrimidin-"Permease"-Mutanten von *Saccharomyces* im Vergleich zum Wildtyp zwar in ihrer Aufnahme-, nicht jedoch in ihrer Exkretionsfähigkeit für Pyrimidinbasen gehemmt sind. Nach unseren Vorstellungen geht durch die Mutation die katalytische Funktion des Bin-

dungsproteins und damit die Asymmetrie des eigentlichen Transportsystems verloren.

An beiden Seiten der Zellmembran ist die Bildung eines Carrier-Substrat-Komplexes nur noch nach Reaktion II des obigen Schemas möglich.

Mit den bisher beschriebenen Vorgängen (erleichterte Diffusion und Recycling) läßt sich jedoch nicht die Akkumulation von Hypoxanthin und Guanin bei anhaltendem Influx erklären. Eine Akkumulation dieser beiden Purinbasen sollte jedoch möglich sein, wenn die IMP-pyrophosphorylase in der Lage ist, den Carrier-Substrat-Komplex C'B mit höherer Affinität als das freie Substrat zu binden und diesen aktiv zu dissoziieren. Der IMP-pyrophosphorylase wird also neben ihrer Bedeutung für den salvage pathway die Funktion einer spezifischen Transportpyrophosphorylase (mit (T) symbolisiert) zugeschrieben.

In unserem Modell katalysiert die Pyrophosphorylase T unter Verwendung von PRPP die Umwandlung der an den Carrier gebundenen Base in das entsprechende Nukleosidmonophosphat, indem sie zunächst den Komplex C'-BMP-T bildet. Daraufhin wird BMP freigesetzt und kann nun über den Prozeß des Recycling zur freien Base abgebaut werden. Sowie freie Basen an der Membranninnenseite wieder mit Carrier-Molekülen assoziieren, werden sie aufs Neue aktiv dissoziiert. Auf diese Weise wird ein Efflux der Basen stark reduziert und deren intrazelluläre Akkumulation erreicht. Da der Carrier Bestandteil der Membran ist, muß auch der Akkumulationsprozess membrangebunden ablaufen.

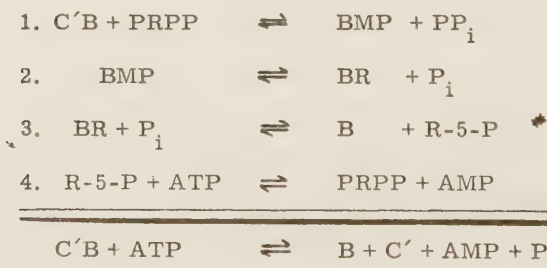
Das wesentliche Charakteristikum des hier entwickelten Modells für den Purinbasen-Transport ist eine Trennung des Akkumulationsprozesses vom eigentlichen Transportvorgang, der nach dem Muster der erleichterten Diffusion erfolgt. Durch diese Trennung ist die scheinbare Diskrepanz, daß zwar ~~drei~~ Substrate über das gleiche System transportiert, aber nur zwei davon akkumuliert werden, erklärbar.

Das nicht akkumulierbare Adenin gelangt über den Mechanismus der er-

leichterten Diffusion in die Zelle und wird dort zu AMP (über die AMP-pyrophosphorylase) oder zu Hypoxanthin (über die Adenin-desaminase) umgewandelt. Das Hypoxanthin kann an der Membraninnenseite mit unbeladenen Carrier-Molekülen assoziieren und wird dann über die (möglicherweise membrangebundene) IMP-pyrophosphorylase unter Energieverbrauch dem Akkumulationsprozess unterworfen.

Als direkte Energiequelle für den Akkumulationsvorgang wird - wie für die Phosphoribosylierung der freien Basen - PRPP angesehen. PRPP kann in wenigen Reaktionsschritten über den Phosphogluconat-Stoffwechselweg aus Glucose unter Verbrauch von ATP hergestellt werden (siehe z. B. LEHNINGER 1970). Als direkte Vorstufe dient Ribose-5-phosphat (R-5-P). Da über das Recycling der Basen immer wieder Ribose-5-phosphat freigesetzt wird, brauchen zur Aufstellung einer Energiebilanz für den Akkumulationsprozess nur die in Abbildung 24 wiedergegebenen Reaktionsschritte berücksichtigt zu werden:

ENERGIE-BILANZ DER BASENAKKUMULATION



Die aktive Dissoziation eines Carrierbasenkomplexes an der Innenseite der Membran erfordert also die Spaltung eines ATP-Moleküls in sein Monophosphat .

Betrachtet man nun die unter dem Aspekt der Energieabhängigkeit in dieser Arbeit durchgeführten Versuche, so lassen sich im Rahmen des hier vorgelegten Modells folgende Aussagen machen.

Zellen der stationären Wachstumsphase können aufgrund der nur in geringem Umfang vorhandenen metabolischen Energie externe Basen im

* s. Fußnote auf S. 43

wesentlichen nur bis zum Konzentrationsausgleich aufnehmen.

Bei Konzentrationsausgleich sollten beide Seiten der Membran die gleiche Anzahl von beladenen bzw. unbeladenen Carriermolekülen enthalten. Mit der Präinkubation in Glucose-Puffer wird nach einer Stimulationsphase auch dem Purin-Transportsystem Energie in Form von PRPP zur Verfügung gestellt. Damit ist eine aktive Dissoziation der an der Innenseite der Membran vorhandenen C'B-Komplexe möglich. Diese aktive Dissoziation führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen beladenen und unbeladenen Carriermolekülen an Innen- und Außenseite und bedingt damit einen gegen den Konzentrationsgradienten nach innen gerichteten Basenflux. Mit sinkender Außen- und steigender Innenkonzentration an freien Basen nimmt jedoch an der Membran-Innenseite - trotz geringer Affinität - die Reassoziationswahrscheinlichkeit zwischen Carrier und Substrat zu und führt zu einer zusätzlichen Belastung der Transportpyrophosphorylase. Ein, wenn auch geringer Efflux, ist nicht zu vermeiden. Durch steigende Akkumulation sollte - auch bei ausreichendem Energieangebot - die Geschwindigkeit des Influx ab- und des Efflux zunehmen. Desgleichen sollte eine starke Einschränkung der metabolischen Energiezufuhr zu einem erhöhten Efflux aus beladenen Zellen führen. Dies wurde in dem in Abb. 23 (S. 39) beschriebenen Versuch beobachtet.

Bei den bisherigen Betrachtungen wurde vernachlässigt, daß bei den Akkumulationsuntersuchungen eine weit stärkere intrazelluläre Konzentrierung von Guanin als von Hypoxanthin festgestellt wurde. Diesem Befund dürfte jedoch im Hinblick auf den Mechanismus des Transports nun keine prinzipielle Bedeutung zukommen, da es mehr Weitermetabolisierungsmöglichkeiten für Hypoxanthin als für Guanin gibt (s. Abb. 1, Seite 2). Außerdem wird ein Großteil des Hypoxanthins als Nucleosid gespeichert, während das für Guanin nicht der Fall ist.

In diesem Zusammenhang scheint überhaupt die Frage wichtig zu sein, welche Purin-Derivate in der Zelle gespeichert werden. Untersuchungen von REICHERT et al. (1972) zeigen, daß in einem Hefeextrakt-Medi-

um wachsende *Schizosaccharomyces*-Zellen in der ersten Hälfte der exponentiellen Phase, also zur Zeit optimaler Basen-Aufnahme (vergl. Abb. 5, Seite 15), nur Inosin und AMP in größerem Umfang ($> 5 \mu\text{Mol/g}$ Trockenhefe $\hat{=}$ $> 1,2 \text{ mM}$) akkumulieren. Die pool-Konzentrationen von Adenosin, Guanosin, Guanin, Xanthin, GMP und wahrscheinlich auch IMP liegen zu dieser Zeit (teilweise weit) unter $1 \mu\text{Mol/g}$ Trockengewicht. Auch der Hypoxanthinpool macht nur einen kleinen Prozentsatz des Inosinpools aus.

Eine genauere Analyse der in Abhängigkeit von der Wachstumsphase erhaltenen pool-Daten weist in Übereinstimmung mit OPPENHEIMER und AVIGRAD (1965) und CUMMINS und MITCHISON (1967) Inosin die Rolle des zentralen Speicher-pools für Purin-Derivate zu. Erste Versuche haben nun ergeben, daß Inosin im Gegensatz zu Hypoxanthin weder wesentlich exkretiert (pur-1 Mutante von *Schizosaccharomyces pombe*, REICHERT und NAGY unveröff.) noch unter unseren Versuchsbedingungen aufgenommen wird (in Glucose-Puffer präinkubierte stationäre *Saccharomyces*-Zellen, WINTER unveröff.). Da auch eine Exkretion von AMP bei Hefen bisher nicht bekannt geworden ist, scheint vom Standpunkt der Zellökonomie die Feststellung interessant zu sein, daß offenbar gerade solche Purin-Derivate gespeichert werden, für die unter "normalen" Bedingungen keine Transportsysteme wirksam sind. Die Existenz dieser beiden Speicherformen führt naturgemäß zu einer erheblichen energetischen Entlastung des Akkumulationssystems für die Purinbasen, zumindest soweit es Hypoxanthin betrifft. Die offensichtliche Abwesenheit einer "Puffer"-Form im Guanin-Zyklus bringt zunächst einige Interpretationsschwierigkeiten mit sich, zumal Guanin bei Hefen nicht in Hypoxanthin oder Adenin umwandelbar ist. Spekulativ sollten sich diese Schwierigkeiten jedoch zum Teil ausräumen lassen, wenn man annimmt, daß die Transportpyrophosphorylase eine geringere Affinität zum Guanin-Carrier-Komplex als zum Hypoxanthin-Carrier-Komplex besitzt. Dann würde in Gegenwart von Hypoxanthin

diese "energetisch günstigere" Base bevorzugt akkumuliert werden.

Auf eine Diskussion möglicher Regulationsmechanismen für den Purinbasen-Transport soll an dieser Stelle verzichtet werden, da die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse (vergl. z. B. Seite 25) keine ausreichende Grundlage hierfür bieten.

Abschließend sei vermerkt, daß der hier beschriebene Transportmechanismus ebenso wie das PEP-Transferase-System für die Zuckeraufnahme bei Bakterien die enge Definition aktiven Transports, wie sie von SITTE (1969, vergl. Seite 5) vorgeschlagen wird, wenig sinnvoll erscheinen läßt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine kinetische Analyse des Purinbasen-Transports zeigt, daß Adenin, Hypoxanthin und Guanin über ein gemeinsames Transportsystem von *Saccharomyces*-Zellen aufgenommen werden.
2. Die Aufnahmegeschwindigkeit hängt vom physiologischen Zustand der Zellen (Wachstumsphase, Energiestoffwechsel), der Temperatur und der externen Substratkonzentration ab.
3. Einige Basenanaloga und "prefilling" mit natürlichen Purinbasen führen zu einer Hemmung der Aufnahme.
4. Im Gegensatz zu Adenin können Hypoxanthin und Guanin als freie Basen intrazellulär gegen einen Konzentrationsgradienten akkumuliert werden.
5. Die Effluxrate beträgt bei ausreichender Energieversorgung nur etwa 0.5 % der Influxgeschwindigkeit. Entzug metabolischer Energie führt zu verstärktem Efflux.
6. Zur Interpretation der experimentellen Daten wird ein Transportmodell vorgeschlagen, das eine Wechselwirkung der IMP-pyrophosphorylase mit dem eigentlichen Transportsystem, das nach dem Mechanismus der erleichterten Diffusion arbeitet, vorsieht.

7. Als unmittelbare Energiequelle für die Akkumulation von Hypoxanthin und Guanin wird Phosphoribosylpyrophosphat angesehen.

LITERATURVERZEICHNIS

- BERGMEYER, H. U. (Herausgeber), Methoden der enzymatischen Analyse, Band II, Verlag Chemie, Weinheim (1970)
- BERLIN, R. D. und E. R. STADTMAN, J. Biol. Chem. 241 (1966), 2679
- BURNS, V. W., Biophys. J. 4 (1964), 151
- COHEN, G. N., und J. MONOD, Bacteriol. Rev. 21 (1957), 196
- CRANE, R. K., Fed. Proc. 24 (1965), 1000
- CUMMINS, J. E., und J. M. MITCHISON, Biochim. biophys. Acta 136 (1967), 108
- DIXON, M. und E. C. WEBB, Enzymes, Longmans, Green and Co. Ltd., 2. ed., London (1964)
- DJEMBO-TATY, M., M. NAGY und H. HESLOT, in Vorbereitung
- EGAN, J. B. und M. L. MORSE, Biochim. biophys. Acta 97 (1965), 310
- GRENSON, M., Europ. J. Biochem. 11 (1969), 249
- DeGROODT, A., Thèse, Université Libre de Bruxelles, 1969
- HANES, C. S., Biochem. J. 16 (1932), 1406
- HARRIS, G., und C. C. THOMPSON, Biochim. biophys. Acta 56 (1962), 293
- HOCHSTADT-OZER, J. und E. R. STADTMAN, J. Biol. Chem. 246 (1971), 5294
- KABACK, H. R., Ann. Rev. Biochem. 39 (1970), 561
- KEPES, A., Biochim. biophys. Acta 40 (1960), 70
- KEPES, A. und N. COHEN, The Bacteria, Vol. IV, Acad. Press, New York (1962), pp. 179
- KOCH, A. L., Biochim. biophys. Acta 79 (1964), 177
- LEHNINGER, A. L., Biochemistry, Worth Publishers, Inc., New York (1970)

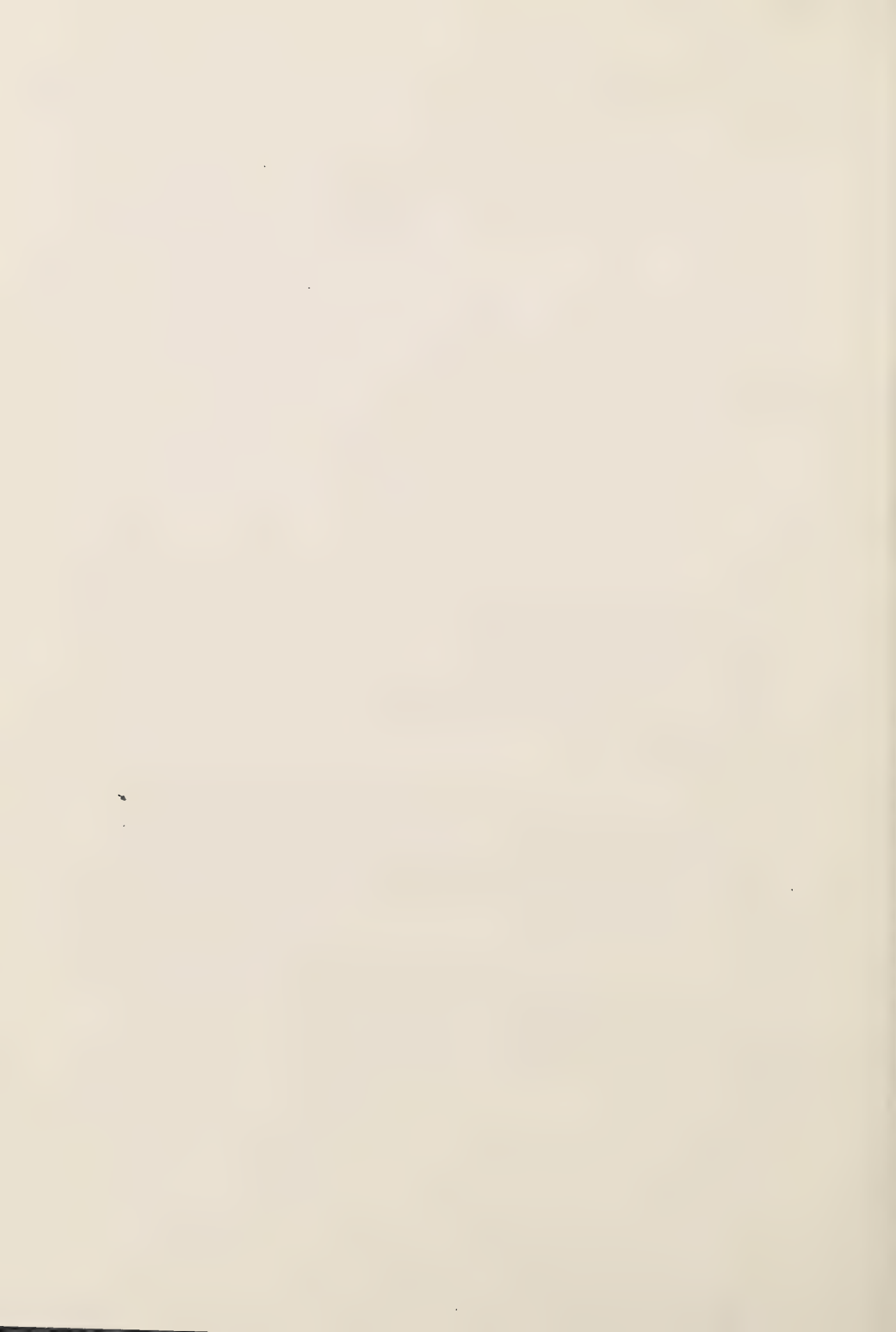
- MICHELER, A. und E. R. LOCHMANN, *studia biophysica* 26 (1971), 207
- NAGY, M., *Biochim. biophys. Acta* 198 (1970), 471
- NAZER, R. N., H. G. LAWFORD und J. TZE-FEI WONG, *Anal. Biochem.* 35 (1970), 305
- PARDEE, A. B., *Science* 162 (1968), 632
- PARDEE, A. B., *Science* 156 (1967), 1627
- PARDEE, A. B. und L. S. PRESTIDGE, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 55 (1966), 189
- POURQUIÉ, J., *Biochim. biophys. Acta* 185 (1969), 310
- POURQUIÉ, J., *Biochim. biophys. Acta* 209 (1970), 269
- POURQUIÉ, J. und H. HESLOT, *Gen. Res. Camb.* 18 (1971), 222
- POURQUIÉ, J., Thèse, Université de Paris, 1972
- REICHERT, U., Dissertation, Freie Universität Berlin, 1969
- REICHERT, U. und M. WINTER, eingereicht bei *Molec. Gen. Genetics* (1972)
- REICHERT, U., M. NAGY und H. HESLOT, eingereicht bei *Europ. J. Biochem.* (1972)
- ROSENBERG, A. H. und WILBRANDT, *J. Gen. Physiol.* 41 (1957), 289
- ROUSH, A. H. und T. R. SHIEH, *Biochim. biophys. Acta* 61 (1962), 255
- SATYANARAYANA, T. und J. G. KAPLAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 142 (1971), 40
- SIMONI, R., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58 (1967), 1963
- SITTE, P., *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, Bd. 82 (1969), 329
- WINKLER, H. H. und T. H. WILSON, *Biochim. biophys. Acta* 135 (1967), 1030

Die Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurden in der Zeit vom Wintersemester 1969/70 bis zum Wintersemester 1971/72 am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Haus V, (ehem. Institut für Biophysik) unter Anleitung von Prof. Dr. E.-R. Lochmann durchgeführt.

Herrn Prof. Lochmann bin ich für Thema und Betreuung der Arbeit und vielfältig gewährte Unterstützung sehr zu Dank verpflichtet.

Herrn Dr. Reichert danke ich besonders für anregende Diskussionen und für die Anleitung bei der experimentellen Durchführung der Arbeit, Frau Lerke Scholing für die hilfreiche technische Assistenz.

Allen Institutsmitgliedern gilt mein herzlicher Dank für die in jeder Hinsicht gewährte Hilfe und die gute Arbeitsatmosphäre.



LEBENS LAUF

Am 24. Mai 1944 wurde ich als Tochter des Versicherungs-mathematikers Ekkehard Winter und seiner Frau, der Foto-grafenmeisterin Hildegard Winter, geb. Brunner, in Reiten-dorf/Sudeten geboren.

Bis zum Abitur besuchte ich folgende Schulen:

Von 1950 bis 1957 die 1. Grundschule Berlin-Charlottenburg, von 1957-1958 die Ricarda-Huch-Schule Berlin (Neusprach-liches Gymnasium), von 1958-1961 die Max-Liebermann-Schu-le Berlin (Mittelschule), von 1961-1964 die C. F. von Siemens-schule (Math. Nat. Gymnasium).

Vom Herbst 1964 bis 1966 studierte ich Romanistik an der Sorbonne/Paris.

Zum Wintersemester 1966 wurde ich für das Biologiestudium an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Hier legte ich zum Sommersemester 1969 die Diplom-Vorprüfung ab.

Das Thema der vorliegenden Arbeit erhielt ich im Winterse-mester 1969/70 von Herrn Prof. Dr. Lochmann.

Seit Anfang 1970 bin ich am Zentralinstitut für Biochemie und Biophysik, Haus V, (ehem. Institut für Biophysik) als wissen-schaftliche Mitarbeiterin (Stipendium der Deutschen Forschungs-gemeinschaft) tätig.

